

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Ativação e maturação folicular e produção embrionária em ovelhas da  
raça Santa Inês em diferentes condições climáticas**

CARLOS AUGUSTO ALANIS CLEMENTE

Belo Horizonte  
2013

**CARLOS AUGUSTO ALANIS CLEMENTE**

**Ativação e maturação folicular e produção embrionária em ovelhas da raça Santa  
Inês em diferentes condições climáticas**

Tese apresentada à Escola de Veterinária  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal  
Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária-UFMG  
2013

C626a Clemente, Carlos Augusto Alanis, 1981-  
Ativação e maturação folicular e produção embrionária em ovelhas da raça Santa Inês em diferentes condições climáticas / Carlos Augusto Alanis Clemente. – 2013.

100 p. : il.

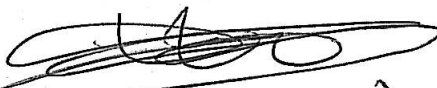
Orientador: Marc Henry

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Ovelha – Reprodução – Teses. 2. Ovelha – Efeito do stress – Teses.  
3. Ovulação – Teses. 4. Embrião – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

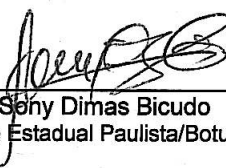
CDD – 636.308 926

Tese defendida e aprovada em 18 de junho de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



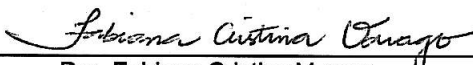
---

Prof. Marc Roger Jean Marie Henry  
Presidente - Orientador



---

Prof. Sôny Dimas Bicudo  
Universidade Estadual Paulista/Botucatu



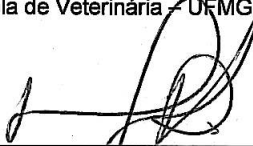
---

Dra. Fabiana Cristina Varago  
UNIFENAS - Universidade José do Rosário Vellano



---

Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Prof. Marcelo Rezende Luz  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Prof. Alan Maia Borges  
Escola de Veterinária - UFMG



**Aos meus pais, Angélica e Carlos, por tudo que sou.  
Sem eles nada disso seria possível.**

**A Tatjana, minha companheira, por toda compreensão.  
Dedicação e apoio constante.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a oportunidade de vivenciar e conquistar mais essa etapa da minha vida...

Aos meus pais, Carlos Gomes e Angélica, pelo exemplo de vida e de cumplicidade, pelo carinho, pelo amor, e pela confiança que sempre depositaram em mim...

A minha esposa, Tatjana Keesen, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando o trabalho nos distanciou fisicamente, e por ser a minha companheira...

Aos meus irmãos, Luciana e Rafael, pelo apoio, carinho e atenção, mesmo que distantes...

A minha família de BH, Dona Cecília, Mariana, Gaby, Bela, Mirela, Rodrigo e Nestor, pelo apoio, carinho, amizade e dedicação que tiveram comigo durante todos os dias em que estive em Minas...

Ao meu orientador Prof. Marc Henry, pelos ensinamentos, pelas conversas e principalmente, por acreditar na minha capacidade de realização deste trabalho...

Aos meus coorientadores Iran Borges e Tadeu Vinhas Voltolini, pela credibilidade, apoio, paciência, exemplos de profissionalismo e dedicação a mim, durante a execução deste trabalho, e pela amizade...

Aos Pesquisadores da Embrapa Semiárido, Gherman Araujo, Daniel Maia e Salete de Moraes pela acolhida, e por proporcionarem a oportunidade de realização destes experimentos junto a Embrapa...

Aos Professores da Univasf, Edilson Lopes, Luciana Andrade, Mabel Cordeiro, Silvia Turco e Maria Helena Matos pela ajuda e colaboração, tanto física quanto intelectualmente na realização deste trabalho...

Ao Prof. Valentin Gheller, pelo auxílio e oportunidade de realização deste experimento junto ao setor de obstetrícia...

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realização deste curso...

Aos meus companheiros Fabiano, Thiago e João Bosco, pela amizade, companheirismo e bom gosto para futebol, além de terem sido, juntos, meu braço direito na execução dos experimentos em Petrolina...

A todos estagiários que presenciaram estes experimentos, pela importante participação, carinho e dedicação com que trataram os animais em nosso dia a dia...

Em especial, a Bia, Renatinha e ao Jesus, pela ajuda incondicional nos dias caloricamente estressantes de experimentos e em todos os outros momentos mais difíceis...

Aos colegas do Lafibra: Lívya, Celso, Mayara e Vinícia, pela ajuda, amizade e momentos de descontração...

Aos colegas do Biofov: Vanessa, Rodrigo, Luciana, Jamile, Thais, Thae, Rico, Vanúzia, Bruna e Yasmin, pela ajuda, “boas músicas”, companheirismo e amizade...

Aos “irmãos” de orientação: Arashiro, Carlos Pelegrino, Ana Maria, Luiza, Betina e Mayara, pela ajuda em vários momentos, pelo incentivo, companheirismo e amizade...

A Eliane, técnica do Laboratório de Fertilização In Vitro, pelo auxílio e dedicação com o trabalho, durante a execução das maturações...

Aos funcionários da Fazenda Modelo: Pitágoras, Juarez, Sorim, Seu Joaquim, Elenicio, Tião, Marcelo, Carlim e Marcelino pela grande ajuda e disponibilidade, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho...

Aos Colegas de iniciação científica: Adriana, Ana Claudia, Beatriz, Guilherme, Isabela e Rafael, pela ajuda nos trabalhos, pelos momentos de descontração e pelas amizades conquistadas...

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EV-UFMG pela contribuição ao meu aprendizado, pelos ensinamentos e experiências transmitidas...

A Luzete e Débora, secretárias do Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela enorme presteza, disponibilidade e exemplo de educação...

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante o doutorado...

A todos os Professores e Amigos, que de alguma forma tenha contribuído para realização desta obra...

***A todos, meu sincero, muito obrigado!!!***

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1. Foliculogênese.....	15
1.1. Características dos folículos ovarianos.....	15
1.2. População folicular ovariana.....	16
1.3. Ativação e crescimento dos folículos pré-antrais.....	16
1.4. Crescimento e desenvolvimento dos folículos antrais.....	17
1.5. Atresia folicular.....	18
1.6. Maturação oocitária.....	18
1.6.1. Maturação nuclear.....	19
1.6.2. Maturação citoplasmática.....	19
2. Fertilização.....	20
3. Desenvolvimento embrionário inicial.....	20
4. Superovulação em ovelhas.....	21
5. Estresse calórico.....	22
5.1. O estresse calórico em ovinos.....	22
5.2. Alterações fisiológicas frente ao estresse.....	23
6. Estresse calórico sobre a reprodução animal com atenção especial em ovinos.....	24
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>1. Capítulo 1. Desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados <i>in vitro</i>, com diferentes concentrações de FSH, obtidos de ovelhas nos meses de maior e menor temperatura do semiárido brasileiro</b> .....	<b>39</b>
1.1. INTRODUÇÃO.....	39
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
1.4. CONCLUSÕES.....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47
<b>2. Capítulo 2. Influência do estresse calórico sobre os parâmetros clínicos, crescimento de folículos por indução hormonal e aspiração folicular por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês</b> .....	<b>52</b>
2.1. INTRODUÇÃO.....	53
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.3. RESULTADOS.....	57
2.4. CONCLUSÕES.....	64
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>3. Capítulo 3. Efeito do estresse calórico materno na qualidade e capacidade de maturação <i>in vitro</i> de oócitos de ovelhas Santa Inês</b> .....	<b>69</b>
3.1. INTRODUÇÃO.....	69
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.4. CONCLUSÕES.....	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77

---

---

## SUMÁRIO

---

<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Influência do sombreamento artificial sobre o conforto térmico e produção de embriões por superovulação de ovelhas mantidas a pasto em duas distintas épocas do ano.....</b>	<b>80</b>
4.1.	INTRODUÇÃO.....	81
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.4.	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

### Capítulo – 1

Tabela 1 -	Condições climáticas e índice de temperatura e umidade (média ± desvio padrão) nas épocas de menor e maior temperatura (Jun/Jul e Out/Nov, respectivamente) do ano.....	42
Tabela 2 -	Percentagens de folículos pré-antrais morfológicamente normais antes e após sete dias de cultivo <i>in vitro</i> , obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura.....	42
Tabela 3 -	Percentagens de folículos primordiais e em crescimento (transição, primário e secundário), nos fragmentos de córtex ovariano, antes e após sete dias de cultivo <i>in vitro</i> , obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura.....	44
Tabela 4 -	Diâmetro médio de folículos pré-antrais e oócitos inclusos em tecido ovariano, antes e após sete dias de cultivo <i>in vitro</i> , obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura.....	46

---

### Capítulo – 2

Tabela 1 -	Média das condições climáticas nos diferentes tratamentos empregados na câmara climatizada.....	54
Tabela 2 -	Médias da frequência respiratória (mov./min.), frequência cardíaca (bat./min.), temperatura cutânea (°C), temperatura retal (°C) e sudorese (g/m <sup>2</sup> /h) de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada.....	57
Tabela 3 -	Efeito da ordem de estimulação hormonal, na média de folículos visíveis no ovário no momento da aspiração videolaparoscópica das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições ambientais de conforto e calor.....	59

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 4 - Comparação entre as diferentes condições ambientais (conforto e calor) na frequência de folículos pequenos (< 2 mm), médios (> 2 < 5 mm) e grandes (> 5 mm) presentes nos ovários, nos momentos da primeira, segunda e terceira aspiração folicular das ovelhas.....	60
Tabela 5 - Proporção de folículos pequenos (< 2 mm), médios (> 2 < 5 mm) e grandes (> 5 mm) presentes nos ovários, no momento da 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> aspiração das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições de conforto e de calor.....	61
Tabela 6 - Efeito da sequencia de aspiração na Taxa de recuperação dos CCOs aspirados por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada.....	63
Tabela 7 - Efeito da sequencia de aspiração na média do número de CCOs obtidos por aspiração videolaparoscópica de ovelhas Santa Inês mantidas nas duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada.....	63

---

### Capítulo – 3

Tabela 1 - Qualidade dos CCOs aspirados das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições ambientais de conforto e calor em câmara climatizada.....	74
Tabela 2 - Classificação quanto à viabilidade para maturação dos CCOs (grau I e II) aspirados das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições ambientais de conforto e calor em câmara climatizada.....	74
Tabela 3 - Percentual de oócitos em apoptose (TUNEL-positivo) dos CCOs aspirados por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada.....	74
Tabela 4 - Expansão das células do cumulus dos CCOs de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo <i>in vitro</i> .....	75
Tabela 5 - Maturação citoplasmática (migração dos granulos corticais) dos oócitos de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo <i>in vitro</i> .....	76
Tabela 6 - Estádios de maturação nuclear dos CCOs de ovelhas Santa Inês em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo <i>in vitro</i> .....	77

---

### Capítulo – 4

Tabela 1 - Temperatura do ar (Ta), temperatura de globo negro (TGN), umidade relativa do ar (UR) e índice de temperatura de globo e umidade (ITGU) nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas (jun/ago e out/nov), nos turnos da manhã (07h) e da tarde (15h).....	85
Tabela 2 - Média ± desvio padrão da frequência respiratória (FR) nos diferentes turnos (manhã e tarde) do dia e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) em função dos tratamentos.....	86
Tabela 3 - Média ± desvio padrão da temperatura retal (TR) nos diferentes turnos (manhã e tarde) do dia e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) em função dos tratamentos.....	87

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 4 - Percentagem de manifestação de estro e tempo entre a retirada da espoja e a manifestação do estro das ovelhas submetidas à superovulação nos tratamentos com e sem sombra nas duas épocas do ano.....	88
Tabela 5 - Comparação entre média do número de ovulações e de folículos anovulatórios de ovelhas Santa Inês nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas estudadas (menores e maiores temperaturas).....	89
Tabela 6 - Produção de embriões de ovelhas Santa Inês submetida à superovulação a pasto nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas estudadas (jun/ago e out/nov).....	90
Tabela 7 - Distribuição dos embriões viáveis quanto a sua fase de desenvolvimento em cada tratamento nas épocas de menores e maiores temperaturas ambientais.....	91

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### Capítulo – 1

Figura 1 - Secção histológica de tecido ovariano não cultivado de ovelhas após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina, mostrando: (A) folículo pré-antral normal, (B) folículo pré-antral degenerado. CG: células da granulosa; O: oócito; N: núcleo do oócito; Nu: Núcleo; Va: vacuolização.....	43
---	----

---

### Capítulo – 2

Figura 1 - Esquema do protocolo utilizado para estimulação hormonal e aspiração folicular .....	55
---	----

---

### Capítulo – 3

Figura 1 - Oócitos com a cromatina marcada por DAPI (A, C, E); oócitos com fragmentação de DNA marcado com a enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinant conjugada ao FITC (B, F); oócito sem marcação da enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinant conjugada ao FITC.....	71
Figura 2 - Estádios de maturação nuclear dos oócitos: (VG) Vesícula Germinativa; (QVG) Quebra da Vesícula Germinativa; (M-I) Metáfase I; (M-II) Metáfase II.....	72

---

### Capítulo – 4

Figura 1 - Médias mensais das temperaturas média (Ta), mínima (Tmin) e máxima (Tmax) do ar (°C) ao longo do ano na fazenda experimental.....	84
Figura 2 - Média dos índices de temperatura de globo e umidade (ITGU) nas diferentes condições ambientais (com e sem sombra) e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) nos turnos da manhã (07 h) e da tarde (15 h).....	85

---

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar diferentes situações de estresse calórico sobre a ativação e desenvolvimento folicular, maturação de oócitos e produção de embriões por ovelhas Santa Inês, quatro experimentos foram realizados. No primeiro, avaliou-se a influência das condições climáticas sobre a ativação e o desenvolvimento de folículos pré-antrais, através do cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano. Os resultados encontrados demonstraram que as condições climáticas da época do ano com temperaturas mais elevadas não prejudicaram a ativação e crescimento dos folículos pré-antrais. No segundo, avaliou-se o desenvolvimento folicular e a recuperação de oócitos por punção ovariana de ovelhas mantidas em condições de conforto e estresse calórico. Os resultados foram redução no número de folículos e de oócitos recuperados na primeira seção de aspiração nas ovelhas em estresse calórico. No terceiro, foi avaliada a influencia do estresse calórico na viabilidade e capacidade de maturação *in vitro* dos oócitos recuperados no experimento anterior. Neste, não foi encontrado diferença entre tratamentos (conforto e calor). No quarto e último experimento, avaliou-se a oferta de sombra artificial sobre a resposta superovulatória e produção de embriões em duas épocas do ano. Não foram encontradas diferenças entre presença e ausência de sombra. Contudo, foi encontrado menor média de ovulações para as ovelhas superovuladas na época de temperaturas mais elevadas. Concluindo, o estresse calórico prejudica o crescimento final e a taxa de ovulação das ovelhas Santa Inês.

**Palavras chave:** embriões, folículos, oócitos, ovinos

## ABSTRACT

*In order to evaluate different situations of heat stress on the activation and follicular development, oocyte maturation and embryo production for Santa Inês ewes, four experiments were conducted. In the first, the influence of climatic conditions on the activation and development of preantral follicles, through in vitro culture of ovarian cortex fragments. The results showed that climatic conditions the season with higher temperatures did not prevent the activation and growth of preantral follicles. Then, it was evaluated follicular development and oocyte retrieval puncture of sheep ovarian maintained under conditions of heat stress and comfort. The results were reduction in the number of follicles and oocytes retrieved in the first section of aspiration in sheep under heat stress. In the third, we evaluated the influence of heat stress on viability and in vitro maturation of oocytes retrieved in the previous experiment. In this, no differences were found between treatments (comfort and warmth). In the fourth experiment, we evaluated if the supply of artificial shade on the superovulatory response and embryo production in two seasons. No differences were found between presence and absence of shade. However, we found lower mean ovulations for superovulated ewes at the time of higher temperatures. In conclusion, heat stress affects the final growth and ovulation rate of Santa Inês sheep.*

**Keywords:** embryo, follicle, oocyte, sheep

## INTRODUÇÃO

A criação de ovinos nos últimos anos tem se mostrado uma atividade de grande importância para algumas regiões do Brasil, com destaque para o nordeste, com 10,1 milhões de cabeças em 2011, região com maior participação do rebanho nacional, com 57,24% (IBGE). Este crescimento da ovinocultura está associado à maior disseminação de animais de raças deslanadas, principalmente em regiões com pouca tradição neste segmento, como o centro-oeste e o sudeste. Entretanto, a maior parte dos rebanhos nacionais ainda está instalada em regiões adversas, muitas vezes, em situações inóspitas, tanto nutricionais como ambientais.

O clima é um dos componentes ambientais que exerce efeito pronunciado sobre o bem-estar animal e, por consequência, sobre a produção e reprodução (Clemente e Borges, 2007), podendo ser considerado um fator regulador ou mesmo limitador da exploração animal para fins econômicos (Pereira, 2005).

Estudos *in vitro* com estresse calórico em tecido ovariano foram realizados por Munhoz e Luna (2008), os quais, após a exposição *in vitro* de tecido ovariano de bovinos, a 42 °C por 20 minutos verificaram redução no diâmetro, tanto dos folículos pré-antrais (primordial e primário), como também dos oócitos, comparados ao controle. Luna et al. (2010), também expuseram tecido ovariano de bovino ao calor (42 °C por 20 min.), e verificaram redução da viabilidade dos folículos primordiais, além de alterações na morfologia de 100% dos folículos. Entretanto, ainda não existem relatos na literatura sobre os efeitos das condições climáticas nesta categoria folicular em ovinos.

Trabalhos avaliando o estresse calórico em ovelhas têm sido realizados com a exposição dos animais a elevadas temperaturas em câmaras bioclimáticas (Naqvi et al., 2004; Gomes, 2011) ou expondo gametas *in vitro* (Santos Junior, 2010). Neste sentido, Santos Junior (2010) expôs complexos cúmulos oócito de ovelhas a 41 °C por 0, 3, 6, 12, 18 e 24 horas durante a maturação *in vitro*, e verificou redução gradativa e significativa na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II, de acordo com os tempos em que foram expostos ao calor. O mesmo ocorreu para a formação de blastocisto, até o dia oito de cultivo. Por outro lado, o mesmo autor encontrou aumento significativo de embriões com apoptose à medida que aumentava os tempos de estresse térmico sobre o oócito, durante a maturação *in vitro*. Contudo, estudos sobre os efeitos do estresse calórico materno sobre a maturação *in vitro* de oócitos de ovinos, ainda não foram realizados.

Em ovelhas, os estudos sobre os efeitos do estresse térmico sobre a função reprodutiva são limitados. Mas sabe-se que a eficiência reprodutiva dos ovinos é adversamente afetada pela hipertermia (Sawyer et al., 1979). Além disso, sabe-se também que altas temperaturas reduzem as taxas de fertilidade e alteram a duração da gestação, aumentam as taxas de aborto e reabsorção embrionária (Ingran e Mount, 1975). O estresse térmico durante a fase folicular em ovelhas, também leva à ovulação de oócitos com reduzida competência de desenvolvimento, afetando a qualidade do embrião (Naqvi et al., 2004).

Galgado no potencial genético que a raça Santa Inês representa para a ovinocultura brasileira, é necessário conhecer melhor a eficiência reprodutiva da raça quando submetida a estresse térmico como o encontrado frequentemente em certas regiões do Brasil, apesar de a raça Santa Inês ser considerada de alta adaptabilidade a localidades com elevadas temperaturas, observa-se que animais desta raça procuram naturalmente por sombreamento quando submetidos à intensa insolação, tentando minimizar os seus efeitos. Portanto, é necessário comprovar e quantificar a susceptibilidade ou resistência ao estresse térmico destes animais e avaliar o seu efeito sobre as características reprodutivas, particularmente, o desenvolvimento folicular.

## HIPÓTESE

O crescimento e desenvolvimento folicular e embrionário precoce de ovelhas da raça Santa Inês são sensíveis ao estresse calórico.

## OBJETIVOS

- 1) Avaliar a influência das condições ambientais de duas distintas épocas do ano (épocas de maiores e menores temperaturas) na região do semiárido brasileiro sobre a ativação e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré antrais de ovinos, submetidos a diferentes concentrações de FSHr durante o cultivo (Capítulo 1).
- 2) Avaliar a influência de duas distintas condições ambientais (temperaturas de conforto e estresse térmico) em câmara climatizada sobre o crescimento folicular induzido hormonalmente e a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração videolaparoscópica de ovelhas Santa Inês (Capítulo 2).
- 3) Avaliar a qualidade dos complexos cumulus-oócito e a capacidade de maturação *in vitro* destes, após serem puncionados de ovelhas Santa Inês, mantidas nas condições de conforto e estresse calórico em câmara climatizada (Capítulo 3).
- 4) Avaliar a influência do fornecimento de sombra artificial sobre as respostas reprodutivas de ovelhas Santa Inês submetidas a protocolos de superovulação nos períodos de maiores e menores temperaturas do ano, na região do semiárido brasileiro (Capítulo 4).

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Foliculogênese

#### 1.1. Características dos folículos ovarianos

A definição de foliculogênese consiste no processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo dominante ou pré-ovulatório (Figueiredo et al., 2008). O folículo é considerado a principal unidade morfofuncional dos ovários de mamíferos (Gore-Langton e Armstrong, 1994). Este tem a função de proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito, além de produzir hormônios esteróides (Gordon, 1994) e peptídeos (Adashi, 1994).

Composto por um oócito rodeado por células somáticas (células da granulosa e tecais), o folículo sofre diversas alterações morfológicas durante a foliculogênese. Dessa forma, à medida que o oócito cresce, as células da granulosa circundantes se diferenciam, e mudam de categoria folicular, classificado os de acordo com o grau de evolução em: folículos pré-antrais ou não cavitários (folículos primordiais, primários e secundários), e folículos antrais ou cavitários (folículos terciários e pré-ovulatórios) (Figueiredo et al., 2008).

Dentre os folículos pré-antrais, os folículos primordiais são os mais numerosos nos ovários das ovelhas. Estes são formados por um oócito quiescente, com formato esférico ou oval, circundado por algumas células da granulosa de formato pavimentoso, sem nenhuma junção específica, apenas uma justaposição entre o oócito e células da granulosa (Lucci et al., 2001).

Com o início do crescimento folicular (ativação), os folículos primordiais gradualmente adquirem células da

granulosa com formato cúbico, tornando-se folículos de transição, para em seguida, formarem os folículos primários, quando a primeira camada de células da granulosa que circunda o oócito seja composta unicamente por células cúbicas (Silva et al., 2004). A partir desse estágio, o oócito passa a manter um estreito contato com essas células, mediado por endocitose (Lucci et al., 2001).

Com a multiplicação das células da granulosa nos folículos, ocorre a formação de mais de uma camada de células cúbicas ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Nessa fase, inicia-se a formação da zona pelúcida (Lucci et al., 2001), bem como a formação das camadas de células da teca a partir do estroma intersticial (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

Após o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação do antro (cavidade repleta de líquido entre as células da granulosa). A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, e tem o seu diâmetro aumentado de forma acentuada, devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa e da teca e aumento da produção de fluido antral, intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos.

O folículo pré-ovulatório é o último estágio do desenvolvimento folicular, este é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas, denominadas de células do *cumulus*. Além disso, as células da granulosa dos folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar, e passam a se diferenciar em resposta ao hormônio luteinizante (LH). A partir deste estágio, ou o folículo se rompe, promovendo a ovulação em resposta ao pico de LH (Driancourt et al., 1991), ou entra em atresia, se o corpo lúteo ainda

estiver ativo. Nos mamíferos de forma geral, os folículos ovarianos de todas as fases de desenvolvimento estão presentes ao longo da vida reprodutiva, e geralmente encontra-se em três estádios: folículos quiescentes, em crescimento ou atresícos. Entretanto, os sinais que ativam os folículos primordiais quiescentes, e os induzem ao início de seu crescimento em direção à ovulação ou atresia ainda não são completamente conhecidos (McNatty et al., 1999).

## 1.2. População folicular ovariana

Na ovelha, a população folicular ovariana é estabelecida ainda na vida fetal. Contudo, o número de folículos por ovário varia muito entre espécies, e entre indivíduos da mesma espécie, podendo ser encontrado em ovelhas, variações de zero a 33.000 folículos por ovário (Amorim et al., 2000), e até mesmo até 160.000 folículos, segundo Driancourt et al. (1991). Destes, aproximadamente 90% encontram-se na fase de folículos pré-antrais, os quais representam o estoque de gametas femininos (Figueiredo et al., 2008).

Apesar desta grande população folicular presente nos ovários, uma redução ordenada, e geralmente de forma exponencial, ocorre no número de folículos pré-antrais ao longo da vida reprodutiva dos animais (Shaw et al., 2000). Essa redução ocorre devido a dois fenômenos fisiológicos que ocorrem nos ovários, a ovulação e a atresia folicular (Skinner, 2005). Apenas uma pequeníssima parte dos folículos formados ainda na vida fetal chega à ovulação, a grande maioria (aproximadamente 99,9%) entram em atresia durante as fases de crescimento e maturação, tanto por apoptose, quanto por degeneração (Figueiredo et al., 2008).

## 1.3. Ativação e crescimento dos folículos pré-antrais

Na espécie ovina, a ativação e o crescimento folicular iniciam-se com a transformação morfológica dos folículos primordiais. Estudos recentes têm demonstrado que estes folículos e demais estádios subsequentes, expressam diferentes fatores de crescimento que parecem controlar a ativação e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais (Figueiredo et al., 2008).

Um desses fatores de crescimento é o *kit ligand* (KL), também denominado *stem cell factor*, que interage com o seu receptor *c-kit*. Em ovinos, esse fator foi demonstrado em células da granulosa de folículos pré-antrais, e o seu receptor (*c-kit*) expresso em oócitos e células da teca de folículos secundários (Motro e Bernstein, 1993). Camundongos transgênicos que não sintetizam KL ou *c-kit* apresentam interrupção da foliculogênese durante os estádios pré-antrais (Yoshida et al., 1996).

Alguns fatores pertencentes à família de fatores de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) também foram encontrados em folículos pré-antrais de ovelhas, assim como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15). Ovelhas transgênicas que não expressam GDF-9 e BMP-15 apresentam crescimento folicular interrompido na fase de folículo primário e são conseqüentemente inférteis (Figueiredo, 2008).

A ativina é outro membro dessa família, que juntamente com seus receptores dos tipos IA, IB, IIA e IIB, também está presente nos folículos pré-antrais (Tisdall et al., 1994). Apesar da folistatina não pertencer a família TGF- $\beta$ , neutraliza a ação da ativina e da BMP-15, controlando suas ações (Otsuka et al., 2001). Diversos trabalhos têm demonstrado a importância

do sistema ativina-folistatina no controle da função ovariana (Van den Hurk e Zhao, 2005). Experimentos *in vitro*, demonstraram que a ativina-A estimula a proliferação das células da granulosa nos folículos pré-antrais e o início da formação de antro nestes folículos. Além disso, regula os receptores do hormônio foliculo-estimulante (FSH) e a atividade da aromatase induzida por este (Xiao et al., 1992).

Apesar do crescimento folicular durante a fase pré-antral não ser dependente de FSH, existem evidências de que o FSH influencia indiretamente essa etapa da foliculogênese (Ataya et al., 1995.).

#### **1.4. Crescimento e desenvolvimento dos folículos antrais**

Em ovelhas, o crescimento e desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van Den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação dos folículos pré-ovulatórios uma etapa crucial a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como, a manutenção da fertilidade (Drummond, 2006).

Os folículos antrais durante a fase inicial de crescimento são pouco sensíveis às variações de gonadotrofinas cíclicas. Nessa fase, suas necessidades de FSH e LH são baixas (Driancourt et al., 1991), e os hormônios gonadotróficos exercem pouca ação sobre a proliferação das células da granulosa e da teca (Hirshfield, 1991).

O fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I), estimula tanto a proliferação quanto à diferenciação de células da granulosa de ruminantes *in vitro*. Nas ovelhas, o IGF-I estimula primeiramente a proliferação das células da granulosa nos folículos pequenos (de um a três milímetros), mas não nos folículos grandes (maiores que cinco milímetros).

Isso, porque nos folículos grandes, o IGF-I passa a estimular a secreção de progesterona nas células da granulosa (Monniaux et al., 1997; Monget e Bondy, 2000).

Na ovelha, a fase terminal do crescimento dos folículos ovarianos tem início com o recrutamento, quando esses atingem diâmetros superiores a dois milímetros. Nessa fase, os folículos são essencialmente dependentes das gonadotrofinas hipofisárias (Monniaux et al., 1997), razão pela qual, essa fase é conhecida como foliculogênese tônica (Driancourt et al., 1991).

As gonadotrofinas aumentam a atividade esteroidogênica nas células da granulosa e células da teca. Esse aumento na síntese e acúmulo de esteróides, especialmente o estradiol, tanto na circulação geral, quanto no fluido folicular, é responsável pelo comportamento estral e o aumento de LH que conduzem à ovulação (Ireland, 1987).

Em pequenos ruminantes, o desenvolvimento folicular ocorre em ondas (Castro et al., 1998), com emergência dessas, ocorrendo um a dois dias após a elevação plasmática de FSH (Ginther et al., 1995). Na ovelha, a secreção pulsátil de FSH ocorre em média a cada cinco ou seis dias, resultando em média, em três pulsos de gonadotrofina durante um ciclo estral de aproximadamente 17 dias (Bister e Paquay, 1983). De fato, aproximadamente 80% das ovelhas apresentam três ondas de emergência folicular em um ciclo estral normal, com a última onda resultando em ovulação (Leyva et al., 1998).

Após a emergência da onda de crescimento folicular, através do recrutamento de um *pool* de folículos responsivos ao FSH, esses crescem até um determinado momento, quando um ou dois destes folículos são selecionados a continuar crescendo, tornando-se dominantes (Driancourt et al., 1991). Durante seu crescimento, os

foliculos dominantes inibem o desenvolvimento dos demais foliculos do mesmo *pool*, fazendo com que estes entrem em atresia, através da supressão da liberação de FSH pela hipófise. Essa supressão está associada à produção de estrógeno e inibina pelo(s) foliculo(s) dominante(s). Caso o corpo lúteo proveniente da ovulação anterior, ainda esteja ativo nos ovários, o foliculo dominante também entra em atresia e uma nova onda de crescimento folicular tem início. Caso não exista corpo lúteo funcional presente no ovário, ocorre um pico de liberação de LH, promovendo a ovulação do foliculo dominante, e a formação de um novo corpo lúteo (Gil, 2003).

### 1.5. Atresia folicular

O número de foliculos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno. Estima-se que aproximadamente, 99,9% sofrem um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima produtividade (Johnson, 2003). A atresia é o fenômeno natural que leva à exaustão das reservas de foliculos pré-antrais e é comum a todas as espécies de mamíferos domésticos, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (Glamoclija et al., 2005).

Na atresia por via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (Farber, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (Barros et al., 2001).

Durante a atresia, muitas características morfológicas da apoptose (morte celular programada) têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa de foliculos

atrésicos. Em foliculos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária (Morita e Tilly, 1999). Nestes foliculos, alterações nas células da granulosa são raramente observadas. À medida que o foliculo se desenvolve, o oócito torna-se altamente resistente, e as primeiras alterações indicativas de atresia, passam a ser observadas nas células da granulosa.

A apoptose é um evento geneticamente determinado, o qual depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos. Essa tem sido observada nos foliculos ovarianos durante toda a vida fetal e adulta. Uma das características marcantes da apoptose é a ativação de nucleases endógenas que quebram o DNA em fragmentos a cada 180-200 pares de bases (Yu et al., 2005). Caracterizando alterações ultra-estruturais de condensação da cromatina nuclear, fragmentação da célula e produção de corpos apoptóticos ligados à membrana (Hussein et al., 2005).

### 1.6. Maturação oocitária

A maturação oocitária corresponde às modificações que ocorrem no oócito nos estágios finais da foliculogênese. Estas alterações que ocorrem entre os bloqueios meióticos dos estágios de prófase I e metáfase II, tanto nucleares, quanto citoplasmáticas, garantem ao oócito competência para finalizar a maturação, ser fertilizado e sustentar os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Portanto, a maturação é uma das etapas mais importantes da produção de embriões tanto *in vitro* como *in vivo* (Mermillod et al., 1999).

Durante a maturação oocitária ocorrem basicamente dois eventos que, apesar de distintos, são interligados e simultâneos: a maturação nuclear e citoplasmática

(Brevini-gandolfi e Gandolfi, 2001). O primeiro tem início com a quebra de vesícula germinativa (QVG) e termina apenas quando a meiose é finalizada, sendo marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão do segundo corpúsculo polar. Já o segundo, é caracterizado por alterações morfológicas e funcionas do oócito (Tosti, 2006).

### **1.6.1. Maturação nuclear**

Na maioria dos animais domésticos, o reinício das divisões meióticas ocorre mais precisamente próximo à ovulação, sob estímulo primário do LH (Dekel, 2005). Este reinício das divisões meióticas marca o início da maturação nuclear do oócito, e corresponde à divisão reducional dos cromossomos, que tem por objetivo a produção de gametas haplóides, aptos a serem fecundados.

Logo após o pico pré-ovulatório de LH, o oócito primário recomeça a primeira divisão da meiose, dando origem a duas células haplóides. Uma destas células, a que preserva pouco citoplasma é expulsa para o espaço perivitelínico e se desintegra logo a seguir (primeiro corpúsculo polar). A outra célula grande, rica em citoplasma (designada agora como oócito secundário) inicia a segunda etapa da maturação (segunda meiose), que novamente é interrompida na fase de metáfase II (MII), sendo concluída no momento da fecundação, quando ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (Araújo et al., 2007).

Durante o crescimento folicular, os oócitos são mantidos no estágio de vesícula germinativa (GV) até o momento do pico pré-ovulatório de LH, principal responsável pelo reinício da maturação dos oócitos (Rodríguez e Farin, 2004). Como os oócitos não apresentam receptores para LH acredita-se que esta sinalização ocorra por mediação de fatores parácrinos, secretados

pelas células da granulosa e enviados ao oócito via junções “gap” comunicantes (GJCs) (Gilula et al., 1978).

Após esta sinalização, ocorre a quebra da vesícula germinativa através da dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina (Curcio et al., 2006). Na sequência, o oócito passa pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI), completando assim a primeira divisão meiótica, e a formação do primeiro corpúsculo polar (Dekel, 2005). O estágio de MII, só é atingido, quando os cromossomos se arranjam no centro do fuso e corpúsculo polar vai para o espaço perivitelínico.

Quando os complexos cumulus-oócito são removidos dos folículos, ocorre reinício “espontâneo” da meiose nos oócitos, independente da presença ou não do pico de LH. Isso ocorre devido à interrupção da sinalização dos fatores inibidores da quebra de vesícula germinativa, pela perda de contato do oócito com as células foliculares através das junções “gap” comunicantes (Byskov et al., 1997).

### **1.6.2. Maturação citoplasmática**

A maturação oocitária não envolve somente a dinâmica de separação cromossômica durante a maturação nuclear, mas também eventos complexos que ocorrem a nível citoplasmático, como a redistribuição das organelas citoplasmáticas, a transcrição de RNAm, a síntese de proteínas e o armazenamento de energia, além de outros fatores necessários para a formação e desenvolvimento do zigoto (Ferreira et al., 2008).

A migração e reorganização de organelas durante a maturação citoplasmática é coordenada por uma rede de microtúbulos. Organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias e os grânulos corticais (GC) exercem importantes funções durante a

maturação e fecundação do oócito. Devido a isso, durante a maturação, estas organelas migram e posicionam-se no citoplasma em locais mais apropriados para iniciar suas atividades específicas.

Durante a progressão meiótica, parte das organelas migra para o centro da célula. As mitocôndrias aumentam em quantidade, assumem posição mais central e passam a se associar as gotículas de lipídeo, enquanto os complexos de Golgi, diminuem o seu desenvolvimento e praticamente desaparecem (Hyttel et al., 1997). O retículo endoplasmático, distribuído de forma uniforme, se desloca para região cortical do ooplasma no estágio de MII (Ferreira et al., 2008).

Já os grânulos corticais podem ser identificados em pequenos grupos (“clusters”) pelo citoplasma dos oócitos imaturos. Sua migração para a periferia do oócito ocorre durante o avanço da maturação. Quando o oócito atinge o estágio de M II, os grânulos corticais estão distribuídos no córtex, próximos a membrana plasmática (Adona et al., 2008).

## **2. Fertilização**

A fertilização é a fusão entre o gameta feminino e o masculino, que permite a formação de um zigoto, com um novo potencial genético capaz de se desenvolver em um novo organismo multicelular (Gilbert, 2003).

Nos mamíferos o processo da fecundação requer três eventos críticos. A passagem espermática entre as células do *cumulus*, a fixação espermática na zona pelúcida e a fusão do espermatozóide a membrana plasmática do oócito. Assim que esses eventos ocorrem, a superfície do oócito sofre modificações para impedir a penetração de outros espermatozoides. Na falha deste mecanismo, pode ocorrer polispermia, ou seja, fertilização com mais

de um espermatozóide, ocasionando a morte embrionária ou desenvolvimento anormal (Hafez e Hafez, 2003).

Após os genomas haplóides das duas células altamente diferenciadas (os gametas) se encontrarem dentro do citoplasma do oócito, ocorre a reprogramação do genoma embrionário para um estado totipotente. Tal reprogramação consiste em extensas modificações epigenéticas do genoma que coordenam as interações entre o núcleo e o citoplasma. Assim, durante a fertilização, os genomas dos gametas estão, inicialmente, com a atividade de transcrição silenciada, então, a reprogramação é concomitante com a ativação do genoma embrionário (Durantthon et al., 2008).

## **3. Desenvolvimento embrionário inicial**

O desenvolvimento embrionário inicial corresponde ao intervalo entre a fertilização e a implantação do embrião, sendo caracterizado como um período de vida livre, que corresponde ao desenvolvimento do embrião na tuba uterina e na fase inicial no útero (Watson et al., 2004). Este representa um período extremamente dinâmico da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única célula, sob o controle genético da transcrição materna, para um conjunto de células altamente ativas sobre seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares e dois eventos importantes ocorrem: a compactação da mórula e a formação do blastocisto. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica (Lane, 2001; Badr et al., 2007).

A compactação dos blastômeros é a principal diferença entre a clivagem de mamíferos e todos os outros animais. Essa etapa permite o posicionamento de células

externas e internas já no estágio de mórula. Onde a maioria das células externas será precursora do trofoblasto, e a maioria das células internas será precursora do embrioblasto (Gilbert, 2003).

A compactação representa a formação do primeiro epitélio de transporte do conceito (Biggers et al., 1988) e está envolvida no estabelecimento da polaridade dos blastômeros, indicando uma mudança nos mecanismos homeostáticos disponíveis para o embrião. É caracterizada por um aumento do contato celular entre blastômeros, o qual permanece até o total desaparecimento dos limites celulares individuais por meio de junções de adesão (Watson e Barcroft, 2001).

Após o desenvolvimento de junções intercelulares compactas da mórula, ocorre o acúmulo de fluido dentro da cavidade central, formando a blastocele. O desenvolvimento do blastocisto é caracterizado pela diferenciação de células do trofoblasto, que se localizam mais externamente e circundam a blastocele, e pela formação da massa celular interna. Essa massa celular interna irá formar as três camadas germinativas primárias do embrião (ectoderma, mesoderma e endoderma) durante o processo de gastrulação (Hafez e Hafez, 2003).

É durante esta fase inicial, que a capacidade de um embrião de responder a mudanças no seu ambiente está limitada, pois grande parte do genoma embrionário ainda está inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula-Lopes e Hansen, 2002).

#### 4. Superovulação em ovelhas

A superovulação consiste em um dos principais passos dos programas de coleta e transferência de embriões em ovinos, e tem como princípio, o aporte exógeno de hormônios que estimulam o crescimento folicular e, subsequente, ovulação de vários folículos.

Os primeiros tratamentos superovulatórios em ovelhas tinham como base o uso de Gonadotrofina Coriônica equina (eCG). Porém, a aplicação de altas doses de eCG resultavam em respostas ovulatórias baixas e extremamente variáveis. Contudo, algumas melhorias têm sido observadas na eficiência dos programas de superovulação e produção de embriões, pela substituição do eCG por preparados de FSH de origem suína, ovina ou caprina (Oliveira, 2011). Com a utilização destes preparados de FSH, passou a se obter melhores taxas de ovulações e menor incidência de folículos anovulatórios, além de melhor uniformização da resposta individual quando comparado aos tratamentos com eCG (Armstrong e Evans, 1983). Todavia, para que a estimulação dos folículos com FSH ocorra de forma adequada, é necessário administrá-lo a cada 12 horas, devido suas concentrações plasmáticas decrescerem a concentrações basais em 10 horas (Demoustier et al., 1988). Isso gera a necessidade de repetir as administrações em curto intervalo de tempo, intensificando o manejo, tornando-o menos prático. Outra desvantagem é que essas preparações também contêm LH, além de outras substâncias não identificadas, que podem prejudicar a resposta ovulatória e a produção de embriões.

A alta variabilidade das respostas à estimulação ovariana é, destacadamente, o maior desafio frente ao aumento da eficiência dos programas de transferência de embriões de ovinos. Acredita-se que esta heterogeneidade nos resultados

estimulatórios, decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral, e não a dinâmica de desenvolvimento folicular da espécie (Oliveira, 2011).

Alguns pontos críticos têm sido detectados, como possíveis responsáveis pelos efeitos negativos, tais como as concentrações de progesterona induzidas pelos dispositivos utilizados no tratamento (Berlinguer et al., 2007), a condição folicular presente ao início do protocolo superestimulatório (Rubianes et al., 1997; González-Bulnes et al., 2002), e a deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH no momento da ovulação (González-Bulnes et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório favorece a resposta ao tratamento, sendo importante a existência de um grande número de folículos de tamanho médio, capazes de crescer até o tamanho ovulatório, e a ausência de um folículo dominante (Kohram et al., 1995). Assim, Rubianes et al. (1997) observaram inicialmente maior resposta estimulatória quando o tratamento gonadotrófico iniciou no dia da ovulação (dia 0). Entretanto, após 72 horas do tratamento, os mesmos autores verificaram que o número de folículos grandes é similar entre fêmeas com início da estimulação no dia 0 e 3, demonstrando que o FSH exógeno é capaz de anular a supressão do folículo dominante sobre os subordinados. Assim, fica evidente que a produção embrionária após superovulação em ovelhas está diretamente ligada ao *status* ovariano no início do tratamento com FSH (González-Bulnes et al., 2005). Pois a quantidade de folículos que podem ser estimulados pelo FSH, depende da quantidade de folículos presentes nos ovários no momento do início da superovulação.

Quando utilizados protocolos convencionais de superovulação, a

população folicular existente no início do tratamento estimulatório é desconhecida. Razão pela qual, o resultado para um mesmo tratamento pode variar entre zero e trinta embriões transferíveis (Gusmão et al., 2007). Assim, protocolos que possibilitem conhecer a fase do ciclo estral em que se encontra a fêmea têm sido desenvolvidos. Estes protocolos permitem iniciar o tratamento superovulatório no dia da ocorrência e emergência da primeira onda folicular. Com a utilização do protocolo do dia zero (dia da ovulação), pode-se reduzir a permanência dos dispositivos intravaginal de progesterona (Fonseca, 2005; Rubianes e Menchaca, 2006; Arashiro et al., 2009).

## 5. Estresse calórico

### 5.1. O estresse calórico

A palavra estresse foi utilizada por Hans Selye em 1936, para definir o estado geral do organismo, o qual, após a ação de estímulos externos e ou internos, responde com uma série de reações sistêmicas de adaptação (Encarnação, 1997; Pereira, 2005). A interação entre a ação dos estímulos e as respostas sistêmicas é conhecida como síndrome geral de adaptação (“general adaptation syndrome” – GAS). Moberg (2000) define estresse como a resposta biológica ou conjunto de reações obtidas, quando o indivíduo percebe uma ameaça a sua homeostase. Caracterizando esta ameaça a homeostase como agente ou estímulo estressor.

Para os animais homeotérmicos, as altas variações das condições ambientais podem ser interpretadas como uma situação de ameaça ao controle de sua temperatura corporal. Dessa forma, pode-se dizer que os fatores ambientais apresentaram-se como agentes estressores.

Segundo Baêta (1985), para cada animal existe uma faixa de temperatura ambiente, na qual o esforço termorregulatório é

mínimo e a eficiência produtiva é máxima. Esta faixa de temperatura adequada é denominada de zona de conforto térmico.

A temperatura do ar ( $T_a$ ) é considerada o fator climático mais importante, dos que incluem o ambiente físico do animal (McDowell, 1974). Segundo Barbosa et al. (2001), dos animais domésticos, o ovino é um dos que apresentam mecanismos anatomofisiológicos mais propícios à sobrevivência em regiões de altas temperaturas, desde que a umidade do ar seja baixa.

A umidade do ar é outra variável com papel marcante no balanço calórico dos animais em ambientes quentes, em que a perda de calor por evaporação é crucial à homeotermia (Neiva et al., 2004). Vale ressaltar, que tanto o excesso quanto a carência da umidade podem atuar de forma prejudicial no balanço calórico. Se o ambiente é quente e muito seco a evaporação é rápida, podendo causar irritação cutânea e desidratação geral. No caso do ambiente ser quente e demasiadamente úmido, a evaporação torna-se muito lenta ou nula, reduzindo a termólise e aumentando a carga de calor do animal (Starling et al., 2002).

Temperatura ambiental elevada, com alta radiação solar de forma direta e indireta, baixa velocidade dos ventos e alta umidade relativa do ar, levam a temperatura efetiva do ambiente frequentemente exceder a zona termoneutra dos animais domésticos, que variam de 5 a 25°C (McDowell, 1972), levando ao estresse calórico.

## **5.2. Alterações fisiológicas frente ao estresse**

Como o Brasil é um país predominantemente de clima tropical, com temperatura média elevada durante quase todo o ano, existe uma preocupação com o desconforto térmico dos animais de

produção, visto que os fatores ambientais podem provocar estresse térmico aos animais e interferir na sua produtividade (Clemente e Borges, 2007).

Na prática da etologia, o bem-estar é avaliado por meio de indicadores fisiológicos e comportamentais. As medidas fisiológicas (temperatura retal, temperatura timpânica, temperatura escrotal, frequências cardíaca e respiratória) associadas ao estresse têm sido usadas baseando-se na premissa de que, se o estresse aumenta, o bem-estar diminui (Raslan, 2007). Nesse sentido, diversos pesquisadores têm trabalhado em busca de informações sobre o grau de adaptabilidade ou tolerância de diversas raças ao estresse calórico. Para tal, utilizam-se das variáveis fisiológicas e comportamentais dos animais, sob condições artificiais (câmara climatizada) e ou naturais de estresse térmico, de acordo com a região em que cada um se encontra.

Os ruminantes são animais homeotermos, ou seja, apresentam funções fisiológicas que se destinam a manter a temperatura corporal constante. Dentro da zona de conforto ou de termoneutralidade, a manutenção da homeotermia ocorre com mínima mobilização dos mecanismos termorreguladores (Nããs, 1989).

Do ponto de vista bioclimático, apesar dos ovinos deslanados serem considerados animais rústicos, a associação entre temperaturas elevadas, alta umidade do ar e radiação solar, também pode acarretar alterações comportamentais e fisiológicas, como aumento da temperatura da pele, elevação da temperatura retal, aumento da frequência respiratória, diminuição da ingestão de alimentos e redução do nível de produção (Neiva et al., 2004; Gomes, 2011; Oliveira et al., 2013).

A primeira condição de conforto térmico dentro de uma instalação é que o balanço térmico seja nulo. Assim, o calor produzido

pelo organismo animal mais o calor ganho pelo ambiente será igual ao calor perdido. Caso contrário, o animal tem que se defender, utilizando mecanismos fisiológicos para manter a termorregulação. A produção de calor, bem como sua dissipação para o meio é um processo interativo, que depende diretamente da fisiologia animal e das condições do ar (Silva, 2000).

Os limites da zona de termoneutralidade são a temperatura crítica inferior (TCI) e a temperatura crítica superior (TCS). Abaixo da temperatura crítica inferior, os ovinos entram em estresse pelo frio, e acima da temperatura crítica superior, em estresse pelo calor (Pereira, 2005). Ao ultrapassar a temperatura crítica superior, começam a atuar os primeiros mecanismos de termorregulação, como vasodilatação periférica, sudorese e polipnéia.

Muitos índices de estresse calórico vêm sendo utilizados em animais, levando-se em conta a taxa respiratória, o volume de ar respirado, a pulsação, a temperatura de superfície corporal, a temperatura corporal interna, o nível de atividade, o tipo de cobertura do corpo e outras características fisiológicas. A temperatura do corpo, a taxa respiratória e o volume de ar respirado são as respostas mais utilizadas ao estresse térmico, isoladamente ou em combinação, para o desenvolvimento dos índices de conforto térmico (Fehr et al., 1993).

O índice de temperatura e umidade (ITU), que relaciona temperatura e umidade relativa do ar, é o mais utilizado pelos pesquisadores para avaliação do estresse térmico. Johnson (1980) considerou que o índice de temperatura e umidade a partir de 72 apresentava situação de estresse calórico para vacas holandesas. O índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU), desenvolvido por Buffington et al. (1981) para avaliação do conforto térmico de vacas leiteiras expostas a ambientes com

radiação solar direta e indireta, considera em seu cálculo a temperatura de globo negro e temperatura de ponto de orvalho.

## **6. Estresse calórico sobre a reprodução animal com atenção especial em ovinos**

O estresse calórico ocorre quando algumas combinações das condições do meio ambiente (temperatura, umidade do ar, incidência da radiação solar) tornam a temperatura maior que a temperatura suportada habitualmente pelos animais (Moberg, 1985). Os caminhos pelos quais o estresse calórico interfere na reprodução, ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, vários estudos mostram que o estresse pode interferir na secreção das gonadotrofinas, afetar a qualidade do oócito e prejudicar o desenvolvimento embrionário (Rivier e Rivest, 1991; Roth et al., 2000).

O hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) atua como um neuromodulador no sistema nervoso central e desempenha um papel importante na integração das respostas orgânicas ao estresse. Existem conexões anatômicas diretas entre os terminais axônicos dos neurônios secretores de hormônio liberador de corticotrofinas e os dendritos de neurônios secretores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Rivier e Rivest, 1991). Devido a essa relação, o hormônio liberador de corticotrofinas foi descrito como um dos principais mediadores com poder de inibir a secreção de GnRH, apesar de os mecanismos pelo quais essa ação acontece não estarem completamente esclarecidos. Rivier e Rivest (1991) verificaram que a infusão bilateral de hormônio liberador de corticotrofinas na área pré-óptica medial, leva a uma redução significativa na liberação de GnRH e das concentrações plasmáticas de LH em fêmeas ovariectomizadas.

Estudando o efeito do cortisol sobre os pulsos de LH em três diferentes épocas do

ano (estação reprodutiva, transição para o anestro e anestro) em ovelhas ovariectomizadas, Breen e Karsch (2006), verificaram que dentro de cada estação, o cortisol reduziu significativamente a amplitude do pulso de LH, a liberação pulsátil total de LH, e a concentração média de LH no plasma. O cortisol também diminuiu a frequência de pulso de LH na estação reprodutiva e no anestro, mas não afetou significativamente a frequência durante o período de transição para anestro.

Um dos mecanismos propostos para a ação dos agentes estressores sobre a amplitude do pulso GnRH/LH, envolve os receptores de glicocorticóides tipo II presentes na hipófise que, em curto tempo, interrompem a estimulação do GnRH sobre a liberação de LH bem como a longo prazo, suprimem o GnRH e a síntese de receptor de GnRH (Dobson et al., 2012).

Elevadas concentrações de corticosteróides produzidos durante o estresse, influenciam diretamente a síntese e a secreção de esteróides gonadais, podendo interromper o desenvolvimento do gameta. No ovário, há evidências *in vitro* que tanto os corticosteróides naturais quanto os sintéticos são significativamente capazes de alterar o estímulo de FSH na diferenciação das células da granulosa. De forma que esteróides da adrenal suprimem a expressão dos receptores de LH nas células da granulosa e diminuem a secreção de estrógeno pela inibição da atividade aromatase (Moberg, 1985). Quando agentes estressores foram impostos a ovelhas durante a fase folicular houve uma redução na concentração de estradiol, bem como um atraso ou inibição da onda pré-ovulatória de GnRH/LH (Dobson et al., 2012).

Roth et al. (2000) submetem vacas da raça Holandesa a um período de estresse térmico, durante a fase folicular, para monitoramento das concentrações séricas de FSH e inibina, além de avaliar o impacto

sobre a dinâmica folicular. Esses autores observaram que, o aumento da temperatura ocasionou um atraso na emergência da onda de FSH que precedia a segunda onda folicular do ciclo estral (aproximadamente quatro dias de atraso) e, além disso, as concentrações séricas de FSH pré-ovulatório foram maiores, e as de inibina foram menores, durante a fase luteal. Uma consequência que foi atribuída a esses fenômenos é o aumento do número de folículos pequenos e médios.

Numerosos trabalhos têm demonstrado que o estresse térmico desencadeia alterações agudas e crônicas nas concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona. Uribe-Velasquez et al. (2001) realizaram estudos com cabras leiteiras sob estresse térmico repetido e intermitente em câmara climática e não encontraram grandes variações nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4), mas verificaram uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de estradiol 17- $\beta$ .

Animais submetidos às condições estressantes durante o período de desenvolvimento folicular, como, por exemplo, transporte (Dobson e Smith, 1995), temperatura e umidade elevadas (Wilson et al., 1998ab), podem comprometer a formação do corpo lúteo (CL). Como consequência, uma produção anormal de progesterona e vida média anormal do CL é manifestada, resultando em infertilidade, em função das consideráveis taxas de perda embrionária precoce (Foley, 1996).

Tabarez-Rojas et al. (2009) trabalhando com ovelhas deslanadas submetidas ao estresse calórico de 6h por dia (37°C e 25% de umidade relativa) do segundo ao sexto dia do ciclo estral (estro = dia zero), encontraram 20,6% a mais de regressão prematura de CL nas ovelhas estressadas por calor do que nas ovelhas do grupo controle (30,1% x 9,5% respectivamente).

O estresse térmico também pode levar a disfunção dos processos reprodutivos através de mecanismos de repercussões indiretas, que está relacionado com mudanças homeocinéticas que regulam a temperatura do corpo, e por consequência comprometem as funções reprodutivas como, por exemplo, a redução na ingestão de alimentos durante o estresse térmico. A redução no consumo de matéria seca é uma estratégia do organismo, na tentativa de declinar a taxa metabólica e, manter o equilíbrio entre o calor interno e do ambiente externo (Turner e Taylor, 1983). Essa alteração alimentar conduz a uma condição de balanço nutricional negativo que tem como efeito o decréscimo nas concentrações de insulina, glicose e fator de crescimento semelhante a insulina – 1 (IGF-1), e aumento nas concentrações de hormônio do crescimento e ácidos graxos não esterificados (Lucy et al., 1992). A insulina, a glicose e o IGF-1 são estimuladores do crescimento folicular e tem efeitos benéficos sobre a qualidade oocitária, além de estarem envolvidos tanto no metabolismo intra-ovariano como na regulação hormonal, principalmente na modulação dos pulsos de LH e ovulação (Rabiee et al., 1997).

Em ovelhas, os estudos sobre o efeito do estresse térmico sobre a função reprodutiva são limitados. A exposição a temperaturas superiores a 32 °C diminui a fertilidade (Kleeman e Walter, 2005) enquanto a exposição ao calor antes e após a ovulação diminui a proporção de embriões viáveis (Naqvi et al., 2004). Da mesma forma, altas temperaturas reduzem as taxas de fertilidade e alteram a duração da gestação, além de aumentarem as taxas de aborto e reabsorção embrionária (Ingran e Mount, 1975).

Diferenças genéticas para tolerância ao calor têm sido observadas em ovinos. As raças que evoluíram em climas quentes, como a Santa Inês (no Brasil) e a Pelibuey

(no México) regulam melhor a temperatura do corpo em condições de estresse térmico, do que as raças que se desenvolveram em climas temperados ou frios, como a Suffolk (Castanheira et al., 2010; Tabarez-Rojas et al., 2009). Além disso, os linfócitos de ovelhas Pelibuey produzem concentrações mais elevadas de proteína do choque térmico 70 (HSP-70) do que linfócitos de ovelhas Suffolk em condições de estresse calórico *in vitro* (Montero et al., 2006).

Adicionalmente é atribuído ao estresse térmico a redução da duração e da intensidade do estro. Nebel et al. (1997), relataram que vacas holandesas em estro durante o verão demonstraram uma média de 4,5 montas por estro, contra 8,6 quando no inverno. Em ovelhas, altas temperaturas ambientais 1,5 a 6 dias antes da data prevista do estro reduziram significativamente o número de fêmeas manifestando comportamento de estro (Sawyer et al., 1979).

Naqui et al. (2004), trabalhando com ovelhas Bharat Merino submetidas a estresse de 40°C, 6 horas por dia durante 4 semanas, verificaram uma duração de estro significativamente menor (31,7 horas), quando comparada com a duração de estro do grupo controle (37,7 horas). Neste mesmo trabalho, os efeitos sobre a ovulação e resposta ovariana das ovelhas estressadas termicamente foram mínimos. Já a influência do estresse térmico sobre a qualidade dos embriões produzidos por essas ovelhas foi evidente. As incidências de embriões anormais encontradas nessas ovelhas foram muito altas, quando comparadas com as produzidas pelas ovelhas mantidas em ambiente controlado.

De acordo com Badinga et al. (1993), o crescimento e o desenvolvimento dos folículos podem ou não ser afetados pelo calor. Mas quando afetados, os efeitos do estresse térmico sobre a função folicular podem envolver mudanças tanto em nível

de folículo, quanto da secreção dos hormônios pituitários que controlam o desenvolvimento folicular.

Uma das consequências do estresse térmico em vacas leiteiras em lactação é a redução no diâmetro do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular. Este costuma ter menos líquido folicular que o de vacas que não sofreram estresse térmico no dia 8 (D-8) do ciclo estral (Badinga et al., 1993). O mesmo ocorre com os folículos subordinados, que apresentam uma diminuição de tamanho em vacas submetidas ao estresse térmico durante a primeira onda folicular (Badinga et al., 1993; Roth et al., 2000).

O estresse térmico diminuiu o número de células da granulosa viáveis nos folículos (Guzeloglu et al., 2001), além disso, inibe o desenvolvimento folicular através da diminuição no número de receptores para o FSH nas células da granulosa (CG), resultando, como já foi citado, na diminuição da atividade do estrogênio nos folículos (Shimizu et al., 2005).

Experimento com cultura de células foliculares de bovinos reduziu a produção de esteróides em temperaturas elevadas (Wolfenson et al., 1997; Bridges et al., 2005). A produção de esteróides por células da teca e granulosa cultivadas *in vitro* foi reduzida quando estas células foram obtidas a partir de vacas expostas ao calor 20-26 dias anteriormente, período em que os folículos possuíam entre 0,5 e 1 mm de diâmetro (Roth et al., 2001a).

Os folículos que estão se desenvolvendo nos ovários das vacas com estresse térmico, mesmo quando danificados continuam crescendo. Aparentemente, esses folículos danificados ovulam oócitos subférteis durante vários meses após a diminuição do estresse (Roth et al., 2001b).

O estresse calórico também pode prejudicar o desenvolvimento e a função dos oócitos. A melhor evidência para esta afirmação vem da vaca em lactação. Neste animal, que é particularmente sensível ao estresse térmico por causa das altas demandas metabólicas da lactação, a competência oocitária para fertilização e subsequente desenvolvimento é reduzido durante as épocas do ano associadas ao estresse por calor (Al-Katanani et al., 2002; Sartori et al., 2002). Há evidências abundantes de que o estresse térmico pode comprometer o oócito e o folículo, no qual está inserido. Altas temperaturas 10 dias antes do dia do estro foram associadas com baixa taxa de fertilidade (Al-Katanani et al., 1999).

O mecanismo pelo qual o estresse térmico compromete a função do oócito durante a oogênese, provavelmente envolve alterações da função folicular, como mostrado em vacas (Putney et al., 1989) e em ratas (Roth et al., 2008). Experimentos com estresse por calor no momento da ovulação e maturação de oócitos podem ou não ter um efeito sobre a capacidade dos oócitos de serem fertilizados, mas os embriões resultantes são mais propensos se desenvolver lentamente ou de forma anormal.

Wang et al. (2009) realizaram estudos *in vitro* para investigar se altas temperaturas (37° a 40°C) durante a maturação oocitária afetam os componentes citoplasmáticos, nucleares ou ambos, utilizando ratas como modelo experimental. Os pesquisadores concluíram que a maturação citoplasmática é mais susceptível ao estresse pelo calor, uma vez que a maturação até metáfase II não foi alterada. As alterações observadas foram incompleta migração dos grânulos corticais, desorganização das mitocôndrias e dos microtúbulos, menor produção de glutathione e maior concentração de glutathione oxidada.

A glutathione é uma molécula responsável pela proteção das células contra danos oxidativos causados pelos radicais livres e é produzida pelas células da granulosa que circundam o oócito como forma de proteção aos efeitos do calor (Munhoz e Luna, 2008). A menor razão glutathione/glutathione oxidada, encontrada em oócitos maturados sob temperaturas próximas a 40°C, indica o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no processo de injúria pelo calor (Wang et al., 2009). Em concordância com essa hipótese, outros estudos encontraram associação entre perdas embrionárias e o aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio (Ozawa et al., 2004) e aumento de espécies reativas de oxigênio em ovidutos e embriões de fêmeas submetidas a estresse térmico (Ozawa et al., 2002; Matsuzuka et al., 2005a,b). Além disso, ao realizar suplementação prévia, com antioxidantes, melatonina ou vitamina E, aos meios de cultivo (Aréchiga et al., 1995; Lawrence et al., 2004) ou das fêmeas (búfalas; Megahed et al., 2008; ratas; Matsuzuka et al., 2005b; Roth et al., 2008; Sakamoto et al., 2008) observa-se atenuação dos efeitos deletérios do estresse térmico sobre a capacidade de desenvolvimento dos oócitos.

A apoptose também desempenha um papel crítico nos efeitos do estresse térmico na maturação do oócito em bovinos. Uma fração (aproximadamente 15 - 30%) de oócitos expostos à temperatura elevada sofre apoptose determinada pelo TUNEL através da marcação dos pronúcleos (Roth e Hansen 2004a, b, 2005; Soto e Smith 2009).

O embrião pré-implantação é suscetível ao estresse térmico materno, mas esta susceptibilidade diminui à medida que o desenvolvimento do embrião avança. Nos bovinos, por exemplo, Ealy et al. (1993) encontraram que a exposição de vacas em lactação ao estresse térmico no dia um após o estro, quando os embriões tinham apenas

uma ou duas células, reduziu a proporção de embriões que se desenvolveram ao estágio de blastocisto no dia oito após o estro. No entanto, o estresse térmico no dia três (8-16 células), cinco (mórula) e sete (blastocistos) após o estro, não teve nenhum efeito sobre a proporção de embriões que chegaram a blastocistos no dia oito. Um padrão semelhante de aquisição de desenvolvimento de resistência térmica ocorre em ovelhas (Dutt, 1964). Os efeitos adversos de choque térmico em embriões cultivados também são reduzidos à medida que se desenvolvem, pelo menos na vaca (Sakatani et al., 2004). Em contraste, no cultivo de embriões de camundongos, não há grande diferença de sensibilidade a temperaturas elevadas nas fases de desenvolvimento de duas células, quatro células e mórula (Aréchiga e Hansen, 1998).

Existem várias razões pelas quais os embriões ganham resistência à elevadas temperaturas com o avanço do desenvolvimento. A geração de espécies reativas de oxigênio em resposta ao choque térmico declina com o avanço no desenvolvimento dos embriões bovinos (Sakatani et al., 2004) enquanto que as concentrações intracelulares do antioxidante citoplasmático glutathione aumentam (Lim et al., 1996). Além disso, há regulação da capacidade do embrião de se submeter à resposta de termotolerância induzida, pela qual a exposição a uma elevação leve na temperatura produz células mais resistentes a uma subsequente elevação severa na temperatura. Este fenômeno não se desenvolve até o 4º dia em bovinos (Paula-Lopes e Hansen, 2002a) ou estágio de oito células em camundongos (Aréchiga et al., 1995).

Aquisição da capacidade para a termotolerância induzida envolve a síntese da proteína do choque térmico 70 (HSP70). Esta proteína, a qual estabiliza as proteínas intracelulares e organelas, e inibe a

apoptose (Brodsky e Chiosis, 2006), pode ser induzida por temperatura elevada já no estágio de duas células em bovinos (Edwards e Hansen, 1996), ou seja, antes da termotolerância induzida ser adquirida. Portanto, outros sistemas moleculares devem estar envolvidos. A glutatona e mudanças no *status* redox podem ser determinantes do desenvolvimento da termotolerância induzida em camundongos (Aréchiga et al., 1995).

Embriões do sexo feminino bovino têm maior capacidade de sobreviver aos efeitos da temperatura elevada do que os do sexo masculino, e essa diferença de gênero parece ser causada por uma menor produção de espécies reativas de oxigênio pelas fêmeas (Pérez-Crespo et al., 2005).

A inibição da apoptose em embriões bovinos, com um inibidor da caspase, aumentou a magnitude da redução no desenvolvimento causada por temperatura elevada (Paula-Lopes e Hansen, 2002b). Assim, a apoptose, se limita às células mais danificadas do embrião, permitindo que o embrião continue a desenvolver-se após uma injúria ambiental. Em bovinos, a indução de apoptose por elevação da temperatura não ocorre até o estágio de 8 - 16 células, no 4º dia após a inseminação (Paula-Lopes e Hansen, 2002a).

Naqvi et al. (2004), estudaram a resposta superovulatória e a taxa de recuperação embrionária em ovelhas Bharat Merino expostas a elevadas temperaturas ambientes. Nesse estudo o efeito do estresse térmico sobre a resposta ovariana, a taxa de ovulação e a resposta superovulatória (proporção de ovelhas com mais de dois corpos lúteos) foi mínimo, tendo havido impacto importante desse fator estressante apenas sobre a qualidade dos embriões e, portanto no número de embriões transferíveis (54,8% de embriões ruins no grupo estressado vs 1% no grupo controle). Os autores destacam porém, o fato de que

os animais utilizados nesse experimento pertenciam a um grupo previamente selecionado com base na taxa de sobrevivência em ambientes quentes do semi-árido.

Silva et al. (2010) estudando a influência das variáveis climáticas sobre a resposta superovulatória em cabras Boer (considerando período seco e chuvoso) também não encontrou efeitos climáticos sobre a produção embrionária, sobretudo em fêmeas múltiparas.

Estudos complementares que visem avaliar o efeito do estresse térmico sobre a reprodução de ovinos não foram encontrados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. *Hum. Reprod.*, v.9, p.815-827, 1994.
- ADONA, P. R.; PIRES, P. R. L.; QUETGLAS, M. D. et al. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.389-397, 2008.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.2611-2615, 1999.
- 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, p.390-396, 2002.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M. et al. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral

- follicles. *Small. Rum. Res.*, v.37, p.269-277, 2000.
- ARASHIRO, E. K. N.; FONSECA, J. F.; HENRY, M. et al. Efeito do protocolo de sincronização da primeira onda folicular sobre a resposta a superovulação em ovelhas da raça Santa Inês. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009. Belo Horizonte – MG. *Anais...* Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2009.
- ARAÚJO, C. H. M.; ARAÚJO, M. C. P.; MARTINS, W. P. et al. Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. *Medicina*, v.40, n.4, p.551-558, 2007.
- 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.
- ARÉCHIGA, C. F.; HANSEN, P. J. Response of preimplantation murine embryos to heat shock as modified by developmental stage and glutathione status. *In Vitro Cel Dev. Biol. Anim.*, v.34, p.655–659, 1998.
- ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. *Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology*, v.19, p.31-42, 1983.
- ATAYA, K.; RAO, L. V.; LAWRENCE, E. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol. Reprod.*, v. 52, p. 365-372, 1995.
- BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S. et al. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*, v.15 p.355-67, 2007.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.39, p.797–810, 1993.
- BAÊTA, F. C. *Responses of lactating dairy cows to the combined effects of temperature, humidity and wind velocity in the warm season.* 1985. 218p. Thesis (Ph.D.) - University of Missouri, Missouri, Columbia.
- BARBOSA, O. R. *Utilização do índice de conforto térmico em zoneamento bioclimático da ovinocultura.* 1994. 76f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BARBOSA, O. R.; MACEDO, F. A. F.; GROES, R. V. et al. Zoneamento bioclimático da ovinocultura no estado do Paraná. *Rev. Bras. Zoot.*, v.30, n.2, p.454-460, 2001.
- BARNES, F. L. The effects of early uterine environment on the subsequent development of embryos and fetus. *Theriogenology*, v.53, p.649-658, 2000.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp. Bioch. Phys.*, v.130, p.401-409, 2001.
- BERLINGUER, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; SUCCU, S. et al. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Dom. Anim. Endoc.*, v.32, n.4, p.303–314, 2007.
- BIGGERS J. D.; BELL J. E.; BENOS D. J. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am. J. Physiol.*, v.255, p.419-432, 1988.

- BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Flutuations in the plasma levels of follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrus gestation and lactation: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, v.19, n.4, p.565-582, 1983.
- BREEN, K. M.; KARSCH, F. J. Does season alter responsiveness of the reproductive neuroendocrine axis to the suppressive actions of cortisol in ovariectomized ewes. *Biol. of Reprod.*, v.74, p.41-45, 2006.
- BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic componentes and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2001.
- 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. Endoc.*, v.29, p.508-522, 2005.
- BRODSKY, J. L.; CHIOSIS, G. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and identification of small molecule modulators. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.6, p.1215-1225, 2006.
- BUFFINGTON, D. E.; COLLAZO-AROCHO, A.; CANTON, G. H. et al. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Amer. Soc. Agric. Eng.*, v.24, p.711-714, 1981.
- BYSKOV, A.G.; YDING-ANDERSEN, C.; HOSSAINI, A. et al. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH. *Mol. Reprod. Dev.*, v.46, p.296-305, 1997.
- CASTANHEIRA, M.; PAIVA, S. R.; LOUVANDINI, H. et al. Use of heat tolerance traits in discriminating between groups of sheep in central Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.42, p.1821-1828, 2010.
- CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. et al. Ultrasonic study of follicular dynamics during the estrous cycle in goats. *Theriogenology*, v. 49, p. 399, 1998.
- CURCIO, B. R.; LEON, P. M. M.; JUNIOR, F. F. et al. Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.30, n.1/2, p.28-35, 2006.
- DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.234, n.1-2, p.19-25, 2005.
- DEMOUSTIER, M. M.; BECKERS, J. F.; VAN DER ZWALMEN, P. et al. Determination of porcine plasma levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*. v.30, p.379-386, 1988.
- DOBSON, H.; SMITH, R. F. *Stress and reproduction in farm animals. J. Reprod. Fert.*, Sup. 49, p. 451-461, 1995.
- DOBSON, H.; FERGANI, C.; ROUTLY, J. E. et al. Effects of stress on reproduction in ewes. *Ani. Reprod. Sci.*, v. 130, p. 135-140, 2012.
- DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewes. *J. Reprod. Fert.*, v.93, p.63-70, 1991.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. and Endocrinol.*, 4:1-11, 2006.
- DURANTHON, V.; WATSON, A. J.; LONERGAN, A. Preimplantation embryo programming: trascription, epigenetics, and

- culture environment. *Reproduction*, v.135, n.2, p.141-150, 2008.
- DUTT, R. H. Detrimental effects of high ambient temperature on fertility and early embryo survival in sheep. *Int. J. Biometeorol*, v.8, p.47-56, 1964.
- EALY, A. D.; DROST, 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.
- ENCARNAÇÃO, E.O. *Estresse e Produção Animal*. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1997. 32p.
- FEHR, R. L.; PRIDDY, K. T.; McNEILL, S. G. et al. Limiting swine stress with evaporative cooling in the southeast. *Trans. Amer. Soc. Agric. Eng.*, v.26, n.4, p.542-545, 1993.
- FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, p.836-848, 2008.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. et al. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.
- FOLEY, G. L. Pathology of the bovine corpus luteum of cows. *Theriogenology*, v.46, p.1413-1428, 1996.
- FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia: *Anais...* 2005, p.16-25.
- GIL, C. V. *Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe*. 2003. 55f. Tese (Veterinary Medicine Doctoral) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia.
- GILBERT, S. F. *Biologia do desenvolvimento*. 5.ed. editora Funpec, 2003.
- GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell. Biol.*, v.78, p.58-75, 1978.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*. v.43, p.689-703, 1995.
- GLAMOCLJIA, V.; VILOVIĆ, K.; SARAGA-BABIĆ, M. et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fert. Steril.*, v.83, p.426-431, 2005.
- GOMES, M. G. T. *Influência do ambiente térmico e de diferentes dietas na superovulação e nos parâmetros fisiológicos de ovelhas Santa Inês*. 2011. 243p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.
- GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J. et al. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by the presence of corpus luteum at the first FSH dosage. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.
- GONZÁLES-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J. et al. Reproductive Season affects inhibitory effects from large follicles on the

- response to superovulatory FSH treatment in ewes. *Theriogenology*, v.60, p.281-288, 2003.
- GONZÁLES-BULNES, A.; BERLINGUER, F.; COCERO, M. J. et al. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. *Theriogenology*, v.64, p.1392-1403, 2005.
- GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: CAB International: Raven Press, p. 4349, 1994.
- GORE-LANGTON, R. E.; ARMSTRONG, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.). *Physiology of reproduction*. New York: USA Raven Press, p.571-628, 1994.
- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTELL, P. et al. The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, v.43, p.41-50, 1995.
- GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A. et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no semi-árido nordestino. *Rev. Bras. Saude Reprod. Anim.*, v.8, p.1-10, 2007.
- GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J. D.; KASSA, T. et al. 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.
- HAFEZ E. S. E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª ed. Manole, São Paulo. 530p, 2003
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 364, p.3341-3350, 2009.
- HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Inter. Rev. Citol.*, v.124, p.43-101, 1991.
- HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Updat.*, v.11, n.2, p.162-178, 2005.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- INGRAM D. L.; MOUNT, L. E. *Man and Animals in Hot Environments*. Springer-Verlag, New York, 1975.
- IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.*, v.34, p.39-54, 1987.
- JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185-201, 2003.
- KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J. et al. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. *Theriogenology*, v.43, p.252, 1995.
- LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology*, v.55, p.225-36, 2001.
- LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, v.50, n.3, p.395-416, 1998.
- JOHNSON, H. D. Environmental management of cattle to minimize the stress of climatic change. *Int. J. Biometeorol.*, v.24, p.65-78, 1980.

- KLEEMANN, D. O.; WALKER, S. K. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology*, v.63, p.2416-2433, 2005.
- LAWRENCE, J. L.; PAYTON, R. R.; GODKIN, J. D. et al. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.2449-2454, 2004.
- LIM, J. M.; LIOU, S. S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of b-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, v.46, p.429-439, 1996.
- LU, C. D. Effects of heat stress on goat production. *Small Rum. Res.*, v.2, p.151-162, 1989.
- LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A. et al. *Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles*. *Small Rum. Res.*, v.41, p.61-69, 2001.
- LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.3615-3626, 1992.
- MATSUZUKA, T.; OZAWA, M.; NAKAMURA, A. et al. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *J. Reprod. Dev.*, v.51, p.281-287, 2005a.
- MATSUZUKA, T.; SAKAMOTO, N.; OZAWA, M. et al. Alleviation of maternal hyperthermia-induced early embryonic death by administration of melatonin to mice. *J. Pineal Res.*, v.39, p.217-223, 2005b.
- MCDOWELL, R. E. *Bases biológicas de la producción animal em zonas tropicales*. 1ª edição. Zaragoza: Acribia, 1974. 692p.
- MCDOWELL, R. E. *Improvement of livestock production in warm climates*. W. A. Freeman and Co., San Francisco, CA. 1972.
- MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T. et al. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil.*, v.54, p.3-16, 1999.
- MEGAHED, G.; ANWAR, M.; WASFY, S. et al. Influence of heat stress on the cortisol and oxidant-antioxidants balance during oestrus phase in buffalo cows (*Bubalus bubalis*): thermo-protective role of antioxidant treatment. *Reprod. In Dom. Ani.*, v.43, p.672-677, 2008.
- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIE, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl 54, p.449-460, 1999.
- MOBERG, G. P. Influence of Stress on Reproduction: Measure of Well-being. In: MOBERG, G. P. *Animal stress*. Bethesda, Maryland: Amer. Phys. Soc., 1985. p.245-267.
- MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G.; MENCH, J. A. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Davis: University of California, 2000. p.1-22.
- MONGET, P.; BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol. Cel. Endocrinol.*, v.163, p.89-93, 2000.
- MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N. et al. Follicular growth and ovarian

- dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil.*, v.51, p.3-23, 1997.
- MONTERO A.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; MONTALDO, H. et al. Concentración de la proteína de choque calórico 70 (HSP-70) en linfocitos de ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. In: *Memorias de XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*, Veracruz, México, pp:4, 2006.
- MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. *Develop. Biol.*, 213, p.1-17, 1999.
- MOTRO, B.; BERNSTEIN, A. *Dynamic changes in ovarian e-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle*. *Dev. Dyn.*, v. 197, p. 69-76, 1993.
- MUNHOZ, A. L. R.; LUNA, H. S. Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico in vitro. *Acta Vet. Bra.*, v. 2, n. 3, p. 85-88, 2008.
- NÄÄS, I.A. *Princípios de conforto térmico na produção animal*. São Paulo: Ícone Ed. 1989. 183p.
- NAQVI, S. M. K.; MAURYA, V. P.; GULYANI, R. et al. The Effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Rum. Res.*, v.55, p.57-63, 2004.
- NEBEL, R. L.; JOBST, S. M.; DRANSFIELD, M. B. G. et al. Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.80, Sup. 1, p.179, (abstr.), 1997.
- NEIVA, J. N. M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S. H. N. et al. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região litorânea do nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Zoot.*, v.33, n.3, p.668-678, 2004.
- OLIVEIRA, M. E. F. Estado da arte da superovulação em ovinos. *Act. Sci. Vet.*, v.39, p.65-70, 2011.
- OLIVEIRA, F. A.; TURCO, S. H. N.; ARAÚJO, G. G. L. et al. Comportamento de ovinos da raça Santa Inês em ambientes com e sem disponibilidade de sombra. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, v.17, n.3, p.346–351, 2013.
- OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; IEMURA, S. et al. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 289, p. 961-966, 2001.
- OZAWA, M.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. *Reproduction*, v.124, p.683–689, 2002.
- OZAWA, M.; MATSUZUKA, T.; HIRABAYASHI, M. et al. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol. Of Reprod.*, v.71, p. 291-296, 2004.
- OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T. A. et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, v.129, p. 621–630, 2005.
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, p.37–42, 2002b.
- 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, 2002a.
- PEREIRA, J. C. C. *Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.
- PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol. Reprod. Dev.*, v.75, p.40-47, 2008.
- PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W. et al. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.19, p.37-51, 1989.
- RABIEE, A. R.; LEAN, I. J.; GOODEN, J. M. et al. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.48, p.9-25, 1997.
- RASLAN, L. S. A. *Zona de conforto térmico e adaptação de ovinos*. Disponível em: [www.farmpoint.com.br/bem-estarecomportamentoanimal](http://www.farmpoint.com.br/bem-estarecomportamentoanimal). Acessado em: 01/06/2007.
- RIVIER, C.; RIVEST, S. Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.*, v.45, p.523-532, 1991.
- RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology*, v.61, p.1499-1511, 2004.
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A. et al. 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, 2001b.
- ROTH, Z.; AROYO, A.; YAVIN, S. et al. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. *Theriogenology*, v.70, p.887-897, 2008.
- ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of oocyte competence by heat shock in cattle. *Biol. Reprod.*, v.71, p.1898-1906, 2004a.
- ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v.71, p.2072-2078, 2004b.
- 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.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. of Reprod. and Fert.*, v.120, p.83-90, 2000.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, v.121, p.745-751, 2001a.
- RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VINÓLES, C. et al. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479-1488, 1997.

- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular , sincronização de estro e superovulação em ovinos. *Act. Sci. Vet.*, v.34, p.231-241, 2006.
- SAKAMOTO, N.; OZAWA, M.; YOKOTANI-TOMITA, K. et al. DL- $\alpha$ -Tocopherol acetate mitigates maternal hyperthermia-induced pre-implantation embryonic death accompanied by a reduction of physiological oxidative stress in mice. *Reproduction*, v.135, p.489–496, 2008.
- SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, v.67, p.77-82, 2004.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A. et al. 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, 2002.
- SAWYER, G. J. The influence to radiant heat load in Merino ewes. II. The relative effects of heating before and after insemination. *Austral. J. Agric. Res.*, v.30, p.1143–1149, 1979.
- SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59–72, 2000.
- SHIMIZU, T.; OHSHIMA, I.; OZAWA, M. et al. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction*, v.129, p.463–472, 2005.
- SILVA J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; AN TOL, H. T. A. et al. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in goat ovaries. *Mol. Reprod. Develop.*, 70:11-19, 2004
- SILVA, R. G. *Introdução à Bioclimatologia Animal*. São Paulo - SP: Editora Livraria Nobel, 2000.
- SILVA, S. V.; CARNEIRO, G. F.; GUERRA, M. M. P. et al. Efeito das condições reprodutivas e climáticas na produção de embriões de cabras Boer superovuladas. *Cienc. Anim. Bras.*, v.11, n.3, p.570-575, 2010.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update*, 2005.
- SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from BclxL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.76, p.637–646, 2009.
- STARLING, J. M. C.; SILVA, R. G.; MUNÔZ, M. C. et al. Análise de algumas variáveis fisiológicas para avaliação do grau de adaptação de ovinos submetidos ao estresse por calor. *Rev. Bras. Zoot.*, v.31, n.5, p.2070-2077, 2002.
- TABAREZ-ROJAS, A.; PORRAS-ALMERAYA, A.; VAQUERA-HUERTA, H. et al. Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia*, v.43, p.671-680, 2009.
- TISDALL, D. J.; HUDSON, N.; SMITH, P., et al. Localization of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrin.*, v.12, p. 181-193, 1994.
- TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.4, p.26, 2006.

- TURNER, H. G.; TAYLOR, St C. S. Dynamic factors in models of energy utilization with particular reference to maintenance requirements of cattle. *W. Revi. Nutr. Diet.*, v.42, p.135-90, 1983.
- URIBE-VELÁSQUEZ, L. F.; OBA, E.; BRASILL, H. A. et al. Efeitos do estresse térmico nas concentrações plasmáticas de progesterona (P<sub>4</sub>) e estradiol 17- $\beta$  (E<sub>2</sub>) e temperatura retal em cabras da raça Pardo Alpina. *Rev. Bras. Zoot.*, v.30, n.2, p.388-393, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- WANG, J. Z.; SUI, H. S.; MIAO, D. Q. et al. Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, v.137, p.181–189, 2009.
- WATSON, A. J. e BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. *Front. Biosci.*, v.6, p.708–730, 2001.
- WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 583-592, 2004.
- WILSON, S. J.; KIRBY, C. J.; KOENIGSFELD, A. T. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2132-2138, 1998b.
- WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N. et al. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2124-2131, 1998a.
- WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W. et al. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.9–19, 1997.
- XIAO, S.; ROBERTSON, D. M.; FINDLAY, J. K. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH) – suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinol.*, v.131, p.1009-1016, 1992.
- YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H. et al. Localization of mRNA encoding e-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *J. Reprod. Fert.*, v. 106, p. 329-35, 1996.
- YU, Y. S.; LUO, M. J.; HAN, Z. B. et al. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cells apoptosis during the estrous cycle of goats. *Small Rum. Res.*, v. 57, p.57-65, 2005.

## CAPÍTULO 1

### **Desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, com diferentes concentrações de FSH, obtidos de ovelhas nos meses de maior e menor temperatura do semiárido brasileiro**

#### **RESUMO**

Com objetivo de avaliar influência das condições climáticas sobre folículos pré-antrais de ovelhas Santa Inês na região semiárida brasileira, avaliou-se a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais, através do cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano, retirados de seis ovelhas em duas distintas épocas do ano (meses de menor e maior amplitude térmica) e submetidos a diferentes concentrações de FSHr (0, 10, 50, 100ng/mL) no meio de cultivo. Os resultados encontrados demonstraram que os fragmentos retirados nos meses de menores temperaturas tiveram maior ativação dos folículos primordiais, quando foram cultivados com 50ng/mL de FSHr ( $P < 0,05$ ), e que os fragmentos retirados nos meses de maiores temperaturas tiveram menor ativação dos folículos primordiais, quando foram cultivados sem FSHr ( $P < 0,05$ ). O crescimento dos folículos pré-antrais foi maior quando estes foram cultivados com 50 ng/mL de FSHr em ambas as épocas do ano. Concluindo, as temperaturas elevadas da época quente não prejudicaram o desenvolvimento folicular, e a adição de 50ng/mL de FSHr ao meio de cultivo melhora a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

**Palavras chave:** Estresse calórico, folículos, FSH, ovinos, pré-antrais

#### ***ABSTRACT***

*In order to evaluate the influence of climatic conditions on pre-antral follicles of Santa Inês sheep in the semiarid Brazil, evaluated the activation and growth of preantral follicles, through in vitro culture of ovarian cortex fragments, removed six sheep in two different seasons (months of lower and higher temperature range) and subjected to different concentrations of FSHr (0, 10, 50, 100ng/ml) in the culture medium. The results showed that the fragments removed during the months of lower temperatures had higher activation of primordial follicles when they were cultured with 50ng/mL of FSHr ( $P < 0.05$ ), and the fragments removed during the months of higher temperatures had less activation primordial follicles when they were grown without FSHr ( $P < 0.05$ ). The growth of preantral follicles was higher when grown with 50 ng / mL FSHr in both seasons. In conclusion, the high temperatures of the hot season, did not prevent follicular development, and the addition of 50ng/mL of FSHr to the culture medium enhances the activation and growth of preantral follicles cultured in vitro.*

**Keywords:** *Follicles, FSH, heat stress, preantral, sheep*

#### **INTRODUÇÃO**

A utilização de biotécnicas como o cultivo *in vitro* de folículos é uma ferramenta essencial na compreensão dos mecanismos

de crescimento e diferenciação dos folículos e oócitos, além de ser uma importante técnica para a obtenção de grandes quantidades de oócitos para produção *in vitro* de embriões. Nesse sentido, diversos

trabalhos vêm tentando desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade, bem como promover o crescimento de folículos pré-antrais, uma vez que, o cultivo dessa classe folicular resultaria no fornecimento de milhares de oócitos viáveis a produção de embriões.

Com relação aos hormônios utilizados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, pode-se destacar o hormônio folículo estimulante (FSH). Este desempenha funções essenciais na estimulação do desenvolvimento folicular, principalmente na fase antral. Entretanto, na fase pré-antral, esse hormônio atua indiretamente, estimulando a expressão de fatores de crescimento que são importantes para a foliculogênese inicial.

Os resultados da aplicabilidade do FSH, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido controversos, o que pode ser parcialmente devido às diferentes preparações comerciais utilizadas, pois existem diversos tipos de FSH, os quais se diferenciam de acordo com a sua origem, como por exemplo, os extraídos da glândula pituitária de suínos (FSHp) e ovinos (FSHo). Outra fonte de FSH que vem sendo bastante utilizada é obtida a partir da tecnologia de DNA recombinante. Este FSH recombinante (FSHr) é mais puro e homogêneo, o que pode propiciar melhores resultados de crescimento folicular (Calder et al., 2003).

Estudos quanto ao estresse calórico em ovelhas têm sido realizados com a exposição dos animais a elevadas temperaturas em câmaras bioclimáticas ou expondo os gametas *in vitro* a diferentes temperaturas. Neste sentido, Santos Junior (2010) expôs complexos cúmulos oócito de ovelhas a 41 °C por 0, 3, 6, 12, 18 e 24 horas durante a maturação *in vitro* e verificou redução gradativa e significativa na porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II, de acordo com os tempos em que foram expostos ao calor. O mesmo ocorreu para a

formação de blastocisto, até o dia oito de cultivo. Por outro lado, o mesmo autor encontrou aumento significativo de embriões com células apoptóticas à medida que aumentava os tempos de estresse térmico sobre o oócito, durante a maturação *in vitro*.

Estudos *in vitro* com estresse calórico em tecido ovariano foram realizados por Munhoz e Luna (2008), os quais, após a exposição *in vitro* de tecido ovariano de bovinos, a 42 °C por 20 minutos verificaram redução no diâmetro, tanto dos folículos pré-antrais (primordial e primário), como também dos oócitos, comparados ao controle. Luna et al. (2010), também expuseram tecido ovariano de bovino ao calor (42 °C por 20 min.), e verificaram redução da viabilidade dos folículos primordiais, além de alterações na morfologia de 100% dos folículos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência, ativação e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de ovinos submetidos a diferentes concentrações de FSHr, obtidos de animais expostos às condições climáticas distintas no ano (maiores e menores temperaturas), na região semiárida brasileira.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Animais, local, alimentação e condição nutricional**

Foram utilizadas seis ovelhas Santa Inês, alojadas juntamente com outras fêmeas do rebanho, em piquetes dotados de bebedouros e saleiros, localizados no campo experimental de Bebedouro, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semiárido), Petrolina - PE. Os animais foram mantidos em 12 piquetes rotacionados de *Tifton 85* irrigado e com sal mineralizado.

Para avaliação das condições nutricionais dos animais, foi utilizada a avaliação do

escore de condição corporal (ECC), realizada 30 dias antes da primeira colheita dos ovários e nos dias das colheitas dos ovários.

### **Obtenção dos dados climáticos**

Os dados climatológicos da região foram obtidos através dos registros da estação agrometeorológica do campo experimental de Bebedouro (Petrolina-PE 09°09'S, 40°22'W), pertencente à Embrapa Semiárido.

Para avaliação das diferentes condições climáticas sobre o desempenho reprodutivo dos animais, foram utilizados os dados climáticos dos últimos 30 dias que antecederam as datas de colheita dos ovários.

O índice de temperatura e umidade foi adotado como o índice de conforto térmico utilizado para a estimativa da situação de estresse ou não dos animais. Este foi calculado usando a fórmula citada por Kelly e Bond (1971):

$$ITU = Ta - 0,55 (1 - UR) (Ta - 58)$$

Legenda:

ITU = índice de temperatura e umidade

Ta = temperatura do ar em graus Fahrenheit

UR = Umidade relativa do ar expressa em valor decimal

### **Obtenção dos ovários**

Os ovários (n=12) foram obtidos por ovariectomia unilateral de seis ovelhas, sob anestesia geral, realizado duas vezes no mesmo animal de acordo com as exigências do comitê de ética. A primeira no período de menores temperaturas (junho-julho), e a segunda no período de maiores temperaturas

(outubro-novembro) do mesmo ano, na região.

Imediatamente após a retirada dos ovários, estes foram lavados em álcool 70% durante 10 segundos e, em seguida, duas vezes em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de HEPES e antibióticos (100 ug/mL de penicilina e 100 ug/mL estreptomicina). O transporte até o laboratório da UNIVASF foi realizado mantendo os ovários a quatro graus Celsius em até três horas, no mesmo meio utilizado anteriormente.

### **Cultivo do córtex ovariano**

Após a retirada dos tecidos circundantes, o córtex de cada ovário foi cortado em 10 fragmentos de aproximadamente 3mm x 3mm x 1mm (largura x comprimento x espessura). Para cada animal, dois destes fragmentos foram escolhidos aleatoriamente e imediatamente fixados para análise histológica (controle fresco). Os demais fragmentos de cada ovário, foram cultivados individualmente em 1,0 mL de meio de cultivo base, isoladamente ou suplementado com 10, 50 ou 100 ng/mL de FSH recombinante (Nanocore, Campinas, Brasil), por sete dias em placas de cultura com 24 poços. O cultivo foi realizado em estufa a 39 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, com substituição dos meios a cada dois dias.

O meio de cultivo base utilizado foi o  $\alpha$ -MEM (pH 7,2-7,4; GIBCO, New York, EUA) suplementado com ITS (0,1 mg/mL de insulina, 0,055 mg/mL de transferrina e 0,05  $\mu$ g/mL de selênio), 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, 100 ug/mL de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina.

Após sete dias de cultivo, os fragmentos de cada ovário em cada meio utilizado, foram fixados por 18 horas em paraformaldeído tamponado a 4%.

### **Análise morfológica e avaliação da ativação e crescimento folicular**

Após o período de fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em blocos de parafina (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Após a inclusão em parafina, as peças de tecido ovariano das ovelhas foram cortadas em secções de 5µm e coradas pelo ácido periódico de Schiff e hematoxilina (Dinâmica, São Paulo, Brasil). A identificação e classificação da fase e morfologia folicular foram realizadas por microscopia óptica (Nikon®, Japão) com ampliação de 400 X.

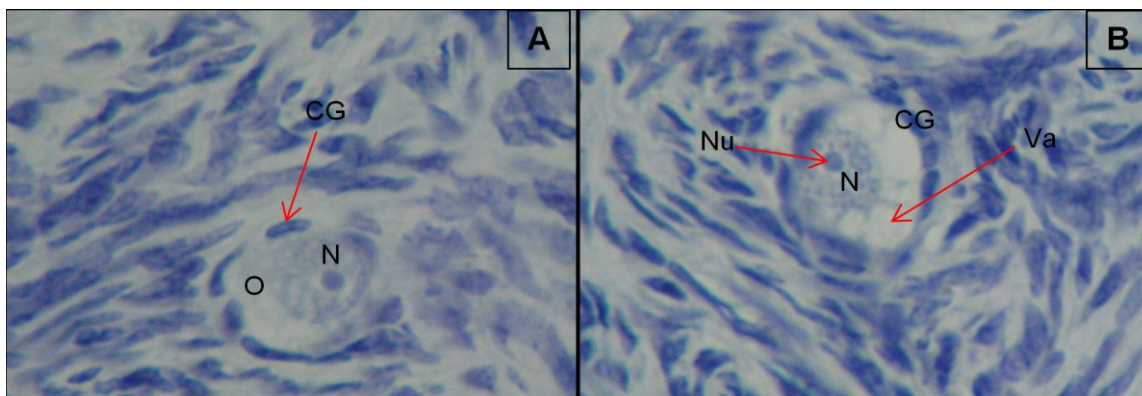
Foram avaliados 180 folículos pré-antrais para cada tratamento (30 folículos por tratamento em cada ovelha x seis repetições = 180 folículos). A classificação utilizada para avaliar os estádios de desenvolvimento destes folículos, foi a definida por Silva et al. (2004). Folículos primordiais (oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso) ou folículos em crescimento (intermediário: uma camada formada por células da pré-granulosa achatada e da granulosa cúbica; primário: uma camada de células da granulosa cuboide; e secundário: duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides ao redor do oócito e nenhum sinal de formação de antro). Além disso, estes folículos também foram classificados individualmente como histologicamente normais (folículo com oócito intacto, circundado por células da granulosa de forma bem organizada em uma ou mais

camadas e núcleo não picnótico) ou degenerados (folículos com oócito retraído, com vacuolização e/ou núcleo picnótico, e/ou com células da granulosa desorganizadas ou destacadas da membrana basal), (Figura 1).

Para avaliar a ativação folicular (transição do folículo primordial para folículo em crescimento) e crescimento dos folículos, apenas os folículos morfolologicamente normais, com o núcleo do oócito visível foram utilizados. A proporção de folículos primordiais, e em crescimento foi calculada no dia zero (controle fresco) e depois de sete dias de cultivo. Além disso, também foi mensurado o maior e menor eixo de cada folículo e de cada oócito, a partir da membrana basal, utilizando o programa Image-Pro Plus ® software. A média destas duas mensurações foi utilizada para determinar os diâmetros tanto dos folículos, quanto dos oócitos.

### **Análise estatística**

As percentagens de folículos morfolologicamente normais, primordiais e em desenvolvimento, e os diâmetros dos folículos e oócitos foram submetidas à análise de variância, em esquema fatorial 4x2 (quatro concentrações de FSHr e duas épocas do ano). O teste de Tukey foi aplicado para comparação entre os tratamentos e as diferenças só foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . O Programa estatístico utilizado foi o Sisvar.



**Figura 1.** Secção histológica de tecido ovariano não cultivado de ovelhas após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina, mostrando: (A) folículo pré-antral normal, (B) folículo pré-antral degenerado. CG: células da granulosa; O: oócito; N: núcleo do oócito; Nu: Nucleolo; Va: vacuolização.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Condições climáticas e estado nutricional

A temperatura média diária foi 2,8 °C superior ( $P < 0,05$ ) no período de out/nov, com relação à temperatura média diária do período de jun/jul (períodos de maiores e menores temperaturas respectivamente, na região), (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições climáticas e índice de temperatura e umidade (média  $\pm$  desvio padrão) nas épocas de menor e maior temperatura (Jun/Jul e Out/Nov, respectivamente) do ano.

Variáveis climáticas	Épocas do ano	
	Jun/Jul	Out/Nov
Ta (°C)	25,1 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	27,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
Ta Min. (°C)	19,3 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	21,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
Ta Max. (°C)	31,5 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	34,4 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
UR (%)	58,3 $\pm$ 6,1 <sup>a</sup>	49,7 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>
ITU	72,7 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	75,8 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>

(a, b) Letras diferentes na mesma linha demonstra diferença significativa entre as épocas ( $P < 0,05$ ). Ta = temperatura do ar; Min. = mínima; Max = máxima; UR = umidade relativa; ITU = índice de temperatura e umidade. Jun/Jul = meses de menores temperaturas; Out/Nov = meses de maiores temperaturas.

Por outro lado, a umidade relativa do ar foi 8,6 % menor no período de out/nov ( $P < 0,05$ ), do que no período de jun/jul (Tabela 1). Contudo, o ITU, índice que considera as duas variáveis anteriores, foi 3,1 pontos superiores ( $P < 0,05$ ) na época de out/nov (75,8), comparado a época de jun/jul (72,7), índices esses, classificados como estresse calórico moderado para algumas espécies, como as vacas leiteiras, segundo Armstrong, (1994).

Além disso, na data da primeira colheita dos ovários, jun/jul, a média do escore de condição corporal (ECC) das seis ovelhas utilizadas foi de 2,7  $\pm$  0,4 pontos (escala de zero a cinco). Quatro meses depois, no momento da colheita do segundo ovário destas mesmas ovelhas (out/nov), o ECC foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ), com média de 3,6  $\pm$  0,4 pontos.

### Sobrevivência dos folículos pré-antrais em diferentes épocas do ano e submetidos a diferentes concentrações de FSHr durante o cultivo

As percentagens de folículos morfológicamente viáveis no córtex ovariano antes e após o cultivo nos meses de jun/jul e out/nov (menores e maiores temperaturas, respectivamente) estão demonstradas na Tabela 2. Após sete dias de

cultura, observou-se redução significativa ( $P < 0,05$ ) nas percentagens de folículos normais, em todos os cultivos testados, em comparação aos controles não cultivados, em ambas as épocas do ano. Essa redução já era esperada, uma vez que os sistemas de cultivo de folículos pré-antrais *in vitro* ainda não são tão eficientes como o desenvolvimento natural destes folículos *in vivo*. Por isso, assim como neste

experimento, diversos sistemas de cultivo vêm sendo testados, com o intuito de melhorar estes resultados.

Com relação ao acréscimo de FSHr, tanto no ensaio realizado em jun/jul, quanto no de out/nov, apenas os cultivos com acréscimo de 50 ng/mL (FSH 50) tiveram maiores médias de percentuais de folículos morfologicamente normais ( $P < 0,05$ ) que os cultivos em meio base sem FSHr (FSH 0).

**Tabela 2.** Percentagens de folículos pré-antrais morfologicamente normais antes e após sete dias de cultivo *in vitro*, obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura

	Folículos morfologicamente normais (%)		
	n	Épocas do ano	
		Jun/Jul	Out/Nov
<b>Controle fresco</b>	180	78,9 ± 3,4 <sup>a</sup>	86,7 ± 6,0 <sup>a</sup>
<b>Cultivo de 7 dias</b>			
FSH 0	180	40,6 ± 10,2 <sup>Bb*</sup>	52,8 ± 4,9 <sup>Ba*</sup>
FSH 10	180	46,1 ± 10,0 <sup>ABb*</sup>	61,1 ± 6,2 <sup>ABa*</sup>
FSH 50	180	52,8 ± 8,0 <sup>Ab*</sup>	65,6 ± 7,2 <sup>Aa*</sup>
FSH 100	180	43,3 ± 10,3 <sup>ABb*</sup>	59,4 ± 6,5 <sup>ABa*</sup>

\* Significativamente diferente do controle fresco ( $P < 0,05$ ). (<sup>a,b</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre colunas (Jun/Jul e Out/Nov), ( $P < 0,05$ ). (<sup>A,B</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre linhas (concentrações de FSH), ( $P < 0,05$ ). Jun/Jul = meses de menores temperaturas; Out/Nov = meses de maiores temperaturas.

Os percentuais de folículos morfologicamente normais, presentes no controle (tecido ovariano não cultivado) não foram diferentes entre as épocas do ano ( $P > 0,05$ ). Entretanto, após sete dias de cultivo, todos os grupos (com ou sem FSHr) apresentaram maiores percentuais de folículos morfologicamente normais ( $P < 0,05$ ) nos meses de out/nov (temperaturas mais elevadas), comparado aos meses de jun/jul (Tabela 2).

Apesar da diferença de temperatura ambiente ( $P < 0,05$ ), encontrada entre as épocas em que foram obtidos os ovários para o cultivo dos folículos pré-antrais (25,1 °C vs 27,9 °C, nos meses de jun/jul e out/nov respectivamente), não se acredita a esta variável, as maiores percentagens de folículos pré-antrais normais encontradas

após sete dias de cultivo, nos meses out/nov. Uma vez que, o ITU médio encontrado em ambas as épocas obteve a mesma classificação de estresse calórico moderado (Armstrong, 1994). Além disso, a grande variação da temperatura e da umidade relativa do ar ao longo do dia (máximas e mínimas) em ambas as épocas (Tabela 1), provavelmente promoveu compensação para o controle da homeostase. De acordo com Silanikove (2000), a severidade do stresse calórico depende da extensão das variações diurnas da temperatura ambiente. Se a temperatura cai durante a noite a temperaturas termoneutras por períodos de 3-6 horas, o animal tem oportunidade suficiente para perder o calor ganho durante o dia anterior (Muller et al., 1994). Por outro lado, acredita-se que esta melhora na manutenção da percentagem de folículos

normais, após sete dias em cultivo nos meses de out/nov, possa estar relacionada ao melhor escore de condição corporal das ovelhas, no momento da segunda colheita dos ovários ( $2,7\pm 0,4$  e  $3,6\pm 0,4$ , nos meses de jun/jul e out/nov respectivamente).

Maurya et al. (2004), em avaliação de ovelhas nativas do semiárido da Índia, distribuídas em dois grupos, estresse pelo calor e alimentação à vontade, e estresse pelo calor e nutricional (restrição de 30% de energia metabólica), evidenciaram que, no grupo submetido apenas ao estresse calórico, houve apenas mobilização de reservas corpóreas e perda de peso, enquanto que, naquele que sofria estresse pelo calor e restrição alimentar, houve alta mobilização das reservas corpóreas e redução na eficiência reprodutiva.

Neste experimento, trinta dias antes da primeira colheita dos ovários, os animais encontravam-se em pastagens de qualidade medianas, junto ao rebanho, em sistema de criação extensiva. Devido a necessidade de isolar estes animais do restante do rebanho (presença de machos), os mesmos foram alojados em piquetes rotacionados próximo ao centro de manejo. No decorrer do ano (diferença de tempo entre as épocas estudadas), de forma não intencional, esses animais acabaram recebendo melhores condições de pastagens e conseqüentemente, melhoraram seus escores de condição corporal.

Com relação ao acréscimo de FSHr, tanto no ensaio realizado em jun/jul, quanto no de out/nov, apenas os cultivos com acréscimo de 50 ng/mL (FSH 50) tiveram médias de percentuais de folículos morfologicamente normais maiores ( $P < 0,05$ ) que os cultivos em meio base sem FSHr (FSH 0).

Embora pouco se saiba sobre a regulação do desenvolvimento dos folículos primordiais, acredita-se que o FSH exerce algum tipo de função na manutenção da viabilidade dos

folículos (Ralph et al., 1996; Saha et al., 2000; Matos et al., 2007). No entanto, Silva et al. (2004) não observaram efeito significativo do FSH sobre a sobrevivência de folículos pré-antrais em caprinos, após 5 dias de cultivo. Isso provavelmente ocorreu porque a concentração de FSH utilizada (100 ng/mL) foi muito alta. No presente trabalho, a adição de 50 ng/mL de FSHr no meio de cultura foi a concentração que manteve a melhor percentagem de folículos normais, após 7 dias cultivo. Resultados semelhantes, foram encontrados por Matos et al. (2007) em caprinos, também após sete dias de cultivo, testando as mesmas concentrações de FSH.

Em cultivos *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano sem a adição de FSH, frequentemente encontram-se extrusão dos oócitos de dentro da estrutura folicular inicial (Cortvrindt et al., 1997) a qual pode ser causada por danos ou redução do número de junções do tipo “gap” comunicantes (Hsueh et al., 1994). Além disso, trabalhos têm demonstrado que o FSH, além de manter a viabilidade, ajuda a inibir a apoptose de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro* em diferentes espécies (ratazana: McGee et al., 1997; suína: Mao et al., 2002; caprina: Matos et al., 2007).

#### **Ativação dos folículos primordiais de ovelhas nas diferentes épocas do ano cultivados em diferentes concentrações de FSHr**

As percentagens de folículos primordiais e em crescimento do córtex ovariano não cultivado (controle fresco), obtido no período de jun/jul foram de 79,6 e 20,4%, respectivamente (Tabela 3). Neste mesmo ensaio (jun/jul), após sete dias de cultivo, todos os grupos testados (FSH 0, 10, 50 e 100) tiveram suas médias de percentuais de folículos primordiais reduzidas ( $P < 0,05$ ) e de folículos em crescimento aumentadas ( $P < 0,05$ ), quando comparadas ao controle fresco. Contudo, dentre os cultivos testados,

aquele com 50 ng/mL de FSHr apresentou maiores percentagens de folículos em

crescimento ( $P < 0,05$ ), comparado ao sem FSHr (Tabela 3).

**Tabela 3.** Percentagens de folículos primordiais e em crescimento (transição, primário e secundário), nos fragmentos de córtex ovariano, antes e após sete dias de cultivo *in vitro*, obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura

		Estádio de desenvolvimento folicular	
		Épocas do ano	
		Jun/Jul	Out/Nov
<b>Folículos primordiais (%)</b>	<b>Controle fresco</b>	79,6 ± 51,1 <sup>a</sup>	80,6 ± 12,2 <sup>a</sup>
	<b>Cultivo de 7 dias</b>		
	FSH 0	56,9 ± 17,6 <sup>Aa*</sup>	48,2 ± 6,5 <sup>Ab*</sup>
	FSH 10	50,3 ± 16,5 <sup>ABa*</sup>	29,8 ± 12,9 <sup>Bb*</sup>
	FSH 50	41,7 ± 18,0 <sup>Ba*</sup>	22,5 ± 15,5 <sup>Bb*</sup>
	FSH 100	47,5 ± 22,0 <sup>ABa*</sup>	29,1 ± 15,8 <sup>Bb*</sup>
<b>Folículos em crescimento (%)</b>	<b>Controle fresco</b>	20,4 ± 51,1 <sup>a</sup>	19,4 ± 12,2 <sup>a</sup>
	<b>Cultivo de 7 dias</b>		
	FSH 0	43,1 ± 17,6 <sup>Bb*</sup>	51,8 ± 6,5 <sup>Ba*</sup>
	FSH 10	49,7 ± 16,5 <sup>ABb*</sup>	70,2 ± 12,9 <sup>Aa*</sup>
	FSH 50	58,3 ± 18,0 <sup>Ab*</sup>	77,5 ± 15,5 <sup>Aa*</sup>
	FSH 100	52,5 ± 22,0 <sup>ABb*</sup>	70,9 ± 15,8 <sup>Aa*</sup>

\* Significativamente diferente do controle fresco ( $P < 0,05$ ). (<sup>a,b</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre colunas (Jun/Jul e Out/Nov), ( $P < 0,05$ ). (<sup>A,B</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre linhas (concentrações de FSH), dentro da mesma categoria folicular ( $P < 0,05$ ). Jun/Jul = meses de menores temperaturas; Out/Nov = meses de maiores temperaturas.

Nos meses de temperaturas mais elevadas (out/nov), as percentagens de folículos primordiais e em crescimento do córtex ovariano não cultivado foram de 80,6 e 19,4% respectivamente (Tabela 3). Neste segundo ensaio (out/nov), assim como no anterior (jun/jul), todos os cultivos testados (FSH 0, 10, 50 e 100) também tiveram suas médias de percentuais de folículos primordiais reduzidas ( $P < 0,05$ ) e de folículos em crescimento aumentadas ( $P < 0,05$ ), após sete dias de cultivo, quando comparadas ao controle fresco.

Quando as comparações foram feitas entre os cultivos testados, todos aqueles que continham FSHr (FSH 10, 50 e 100) apresentaram menores percentuais de folículos primordiais ( $P < 0,05$ ) e maiores

percentuais de folículos em crescimento ( $P < 0,05$ ), comparado ao sem FSHr (Tabela 3).

Na comparação entre as épocas de temperaturas mais frescas (jun/jul) e mais quentes (out/nov), as percentagens de folículos primordiais e em crescimento do córtex ovariano não cultivado, não foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), com valores de 79,6 x 80,6% e 20,4 x 19,4%, respectivamente (Tabela 3). Contudo, após sete dias de cultura, menores percentuais de folículos primordiais e concomitantemente, maiores percentagens de folículos em crescimento ( $P < 0,05$ ) foram encontrados nos meses mais quentes, em todos os fragmentos cultivados, quando comparado aos meses com temperaturas mais frescas (Tabela 3).

Após o cultivo de tecido cortical ovariano caprino, durante cinco dias, Silva et al. (2004) mostraram que o FSH (100 ng/mL), não foi capaz de promover a ativação de folículos primordiais em caprinos. Por outro lado, Matos et al. (2007) demonstraram que concentração mais baixa de FSH (50 ng/mL) pode melhorar a sobrevivência e a ativação folicular. Neste trabalho, a adição de 50 ng/mL de FSHr no cultivo de tecido ovariano de ovelhas, aumentou a ativação folicular após sete dias de cultura nos meses de jun/jul ( $25,1 \pm 1,2$  °C e escore corporal  $2,7 \pm 0,4$ ). Todos os cultivos que receberam FSHr aumentaram a ativação folicular nos meses out/nov ( $27,9 \pm 1,0$  °C e escore corporal  $3,6 \pm 0,4$ ), evidenciando a maior ativação dos folículos primordiais, quando os animais se encontram em melhores condições nutricionais.

Além disso, Joyce et al. (1999) relataram que a FSH estimula a expressão de RNAm do *Kit ligand* em células da granulosa de folículos pré-antrais. O *Kit ligand* tem se mostrado ser essencial para o crescimento de oócitos (Eppig, 2001) e na ativação de folículos primordiais (Parrot e Skinne, 1999). O FSH também ajuda a modular os níveis de BMP-15, GDF-9 nos folículos em crescimento (Thomas et al., 2005) e estes

fatores de crescimento são essenciais para o desenvolvimento dos folículos primordiais e primários de ovinos (Galloway et al., 2000).

#### Crescimento *in situ* dos folículos pré-antrais das ovelhas

Na tabela 4 estão os resultados obtidos para os diâmetros dos folículos e oócitos, antes e após a cultura de sete dias, nas duas diferentes épocas do ano.

Após sete dias de cultivo, todos os grupos da época jun/jul, apresentaram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no diâmetro folicular, comparados ao diâmetro folicular do tecido ovariano não cultivado (controle). Entretanto, na época out/nov, somente o tecido ovariano cultivado no meio controle (FSH 0), não teve o diâmetro folicular aumentado no sétimo dia de cultivo, comparado também ao córtex ovariano não cultivado. Além disso, os folículos cultivados na presença de 50 ng/mL de FSHr tiveram maior aumento no diâmetro folicular após sete dias de cultura, comparados aos outros meios testados ( $P < 0,05$ ), em ambas as épocas. Este aumento, também foi verificado nos diâmetros dos oócitos, nas mesmas condições de cultivo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Diâmetro médio de folículos pré-antrais e oócitos inclusos em tecido ovariano, antes e após sete dias de cultivo *in vitro*, obtidos de ovelhas em duas diferentes épocas do ano, e cultivados na presença de 0, 10, 50 e 100 ng/mL de FSH recombinante no meio de cultura

	Diâmetros			
	Folicular ( $\mu\text{m}$ )		Oocitário ( $\mu\text{m}$ )	
	Jun/Jul	Out/Nov	Jun/Jul	Out/Nov
<b>Controle</b>	$47,36 \pm 5,84^a$	$51,01 \pm 6,37^a$	$36,12 \pm 4,48^a$	$38,52 \pm 5,46^a$
<b>Cultivo 7 dias</b>				
MEM	$54,92 \pm 7,96^{Ba*}$	$55,53 \pm 12,78^{Ba}$	$39,74 \pm 5,42^{Ba}$	$42,48 \pm 9,91^{Ba}$
FSH 10	$56,7 \pm 10,55^{Ba*}$	$59,84 \pm 10,87^{Ba*}$	$40,12 \pm 7,83^{Bb*}$	$46,63 \pm 7,52^{A Ba*}$
FSH 50	$63,85 \pm 12,83^{Aa*}$	$66,53 \pm 14,30^{Aa*}$	$46,11 \pm 11,06^{Ab*}$	$51,70 \pm 12,83^{Aa*}$
FSH 100	$54,93 \pm 5,43^{Bb*}$	$59,03 \pm 8,62^{Ba*}$	$39,64 \pm 3,67^{Bb}$	$45,26 \pm 6,58^{Ba*}$

\* Significativamente diferente do controle fresco ( $P < 0,05$ ). (<sup>a,b</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre colunas (Jun/Jul e Out/Nov), ( $P < 0,05$ ). (<sup>A,B</sup>) Letras diferentes demonstram diferenças entre linhas (concentrações de FSH), ( $P < 0,05$ ). Jun/Jul = meses de menores temperaturas; Out/Nov = meses de maiores temperaturas.

A época do ano influenciou no crescimento folicular apenas dos fragmentos cultivados com 100 ng/mL de FSHr, com maior diâmetro folicular ( $P < 0,05$ ) na época de maiores temperaturas. Já o diâmetro dos oócitos, foi maior na época out/nov (maiores temperaturas), em todos os cultivos, exceto o cultivo com meio controle (FSH 0), o qual não apresentou diferença entre as épocas do ano ( $P > 0,05$ ).

Matos et al. (2007), testando as mesmas concentrações de FSH, também obtiveram maior aumento do diâmetro folicular, quando os tecidos ovarianos de caprinos foram cultivado na presença de 50 ng/mL de FSH durante sete dias. Itoh et al. (2002), assim como neste experimento, demonstraram que 50 ng/mL de FSH aumentou tanto o diâmetro dos folículos, quanto dos oócitos em bovinos, após 13 dias cultura. A expressão do receptor para FSH parece se desenvolver progressivamente durante a transição do folículo primordial para primário, e para folículo secundário (Oktay et al., 1997). RNAm para receptores de FSH já foram detectados em folículos com apenas uma ou duas camadas de células da granulosa (Bao e Garverick, 1998).

A presença de receptores de FSH nestes folículos iniciais, presumivelmente, explica o efeito do FSH no crescimento do oócito nos folículos pré-antrais, uma vez que existem receptores de FSH nos oócitos, acredita-se que o FSH possa atuar em ambas as células promovendo o crescimento e desenvolvimento folicular (M'eduri et al., 2002). Em estudos *in vivo* (Campbell et al., 2000) e *in vitro* (Gutierrez et al., 2000) foi demonstrado que o FSH pode acelerar a taxa de crescimento folicular pré-antral.

Outros autores, também observaram que o FSH promove aumento no diâmetro folicular e proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais em diferentes espécies (bovina: Saha et al., 2000; caprina: Silva et

al., 2004; Matos et al., 2007; ovina: Cecconi et al, 1999). Além disso, sabe-se que o FSH estimula a formação do antro e esteroidogênese em células da granulosa (Gutierrez et al, 2000; Mao et al, 2002; Mitchell et al, 2002).

Nos ruminantes, o folículo primordial cresce até se tornar atresico ou continua crescendo até a ovulação. Embora este crescimento folicular seja controlado principalmente por fatores de crescimento produzidos localmente nos ovários, vários fatores ambientais, como a nutrição, podem influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade do oócito e, conseqüentemente, a fertilidade (Garnsworthy e Webb, 1999; Webb et al., 2003). Além dos efeitos nutricionais fetais e pós-natais sobre a taxa de ovulação em adultos, há momentos durante a vida adulta nos quais a taxa de ovulação também é particularmente sensível ao fornecimento de nutrientes. Em ovelhas, um destes momentos é cerca de seis meses antes da monta, quando os folículos ovarianos emergem do *pool* de folículos primordiais (ativação folicular) e podem ter seu crescimento comprometido. Neste momento, as baixas condições nutricionais reduzem o número de folículos que emerge e que estará disponível para ovulação. Da mesma forma, o contrário também ocorre (Almeida et al., 2007).

## CONCLUSÕES

As temperaturas mais elevadas encontradas nos meses de outubro a novembro da região semiárida de Petrolina - PE, não prejudicaram a sobrevivência e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

O acréscimo de 50 ng/mL de FSH recombinante ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano melhorou a taxa de sobrevivência e promoveu maior ativação de folículos primordiais e crescimento de folículos pré-antrais ativados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. P.; SOUZA, A. L.; MENEZES, E. S. B. et al. Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes. *Rev. Bras. Nut. Anim.*, v.1, p.34-65, 2007.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2044-2050, 1994.
- ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B. S. et al. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep pré-antral follicles. *Small Rum. Res.*, v.70, p.93-100, 2007.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1903-1921, 1998.
- CAMPBELL, B. K.; TELFER, E. E.; WEBB, R. et al. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.163, p.137-139, 2000.
- CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C. et al. Responsiveness of bovine cumulus oocyte - complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod. Biol. Endoc.*, v.14, p.1-12, 2003.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M. et al. In vitro development of sheep pré-antral follicles. *Biol. Reprod.*, v.60, p. 594-601, 1999.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reprod.* v.12, p.759-68, 1997.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-38, 2001.
- GALLOWAY, S. M. ; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.*, v. 25, p.279-83, 2000.
- GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. p.39-58, In: *RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION*. ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K, 1999.
- GOMES, M. G. T. *Influência do ambiente térmico e de diferentes dietas na superovulação e nos parâmetros fisiológicos de ovelhas Santa Inês*. 2011. 243p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.
- GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.
- GUTIERREZ, C. G; RALPH, J. H.; TELFER, E. E. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.*, v.62, p1322- 28, 2000.
- HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* v.15, p.707-24, 1994.
- ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H. et al. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles

- cultured in a serum-free medium. *Biol. Reprod.* v.67, p.1099–105, 2002.
- JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K. et al. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev. Biol.* v.214, p.342–53, 1999.
- KELLY, C. F.; BOND, T.E. Bioclimatic factors and their measurements. In: NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCES (Ed.). *A guide to environmental research on animals*. Washington: National Academic of Sciences, 1971. p.71-92.
- LUNA, H. S.; MUNHOZ, A. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N. et al. Efeito do estresse calórico in vitro em folículos pré-antrais de *Bos indicus*. *Vet. Foco*, v.8, n.1, p.80-88. 2010.
- MAGALHÃSES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B. et al. Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. *Biocell*, v.33, n.2, p.91-97, 2009.
- MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R. et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v.75, p.182-188, 2011.
- MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F. et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation in vitro. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1197-1203, 2002.
- MATOS M. H. T; LIMA-VERDE I. B.; LUQUE, M. C. A. et al. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, v.15, p.173-82, 2007.
- MAURYA, V. P.; NAQVI, S. M. K.; MITTAL, J. P. Effect of dietary energy level on physiological responses and reproductive performance of Malpura sheep in the semi-arid regions of India. *Small Rum. Res.*, v.55, p.117-122, 2004.
- MCGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endoc.* v.138, p.2417–24, 1997.
- M'EDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M. A. et al. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v.87, p.2266–76, 2002.
- MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *Human Reprod.* v.17, p.1181–8, 2002.
- MULLER, C. J. C.; BOTHA, J. A.; SMITH, W. W. Effect of shade on various parameters of Friesian cows in a Mediterranean climate in South Africa. 1. Feed and water intake, milk production and milk composition. *South Afric. J. Anim. Sci.*, v.24, p.49–55, 1994.
- MUNHOZ, A. L. R.; HÉLDER SILVA LUNA, H. S. Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico in vitro. *Act. Vet. Bras.*, v.2, n.3, p.85-88, 2008.
- NAQVI, S. M. K.; MAURYA, V. P.; GULYANI, R. et al. The Effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Rum. Res.*, v.55, p.57-63, 2004.

- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1682–1686, 2003.
- OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.82, p.3748-51, 1997.
- PARROT, J. A. E SKINNER, M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.4262–71, 1999.
- RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R. et al. Efeito de diferentes concentrações de hormônio foliculo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento in vitro de foliculos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. *Act Vet. Brasili.*, v.4, n.3, p.144-152, 2010.
- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* v.63, p.27–39, 2000.
- SANTOS JUNIOR, E. R. *Efeito do estresse térmico na maturação in vitro de oócitos caprinos e ovinos em protocolos de produção de embriões*. 2010, 114p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife, PE.
- SILVA, J. R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H.T. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. v.61, p.1691-1704, 2004.
- SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALISSON, V. et al. Role of gonadotropins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *J. Reprod. Fert.*, v.113, p.19–26, 1998.
- THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* v.146, p.941-9, 2005.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G. et al. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod. Dom. Rum. (Supplement)*, v.61, p.71–90, 2003.
- WU, J.; EMERY, B. R.; CARREL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.*, v.64, p.375-81, 2001.

## CAPÍTULO 2

### **Influência do estresse calórico sobre parâmetros clínicos, crescimento de folicular por indução hormonal e recuperação de complexos cumulus-oócito por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês**

#### **RESUMO**

Com o objetivo de avaliar os parâmetros clínicos fisiológicos, o crescimento folicular e a recuperação de complexos cumulus-oócito de ovelhas submetidas às condições ambientais de conforto e estresse calórico, foram colocados sete ovelhas da raça Santa Inês em câmara climática, nas seguintes condições ambientais: conforto (24,4 °C e UR de 68%) e calor (35,4 °C e UR de 67,4%). Após 30 dias sobre estas condições ambientais, estas ovelhas tiveram seus parâmetros clínicos avaliados e seus folículos ovarianos avaliados e aspirados por punção folicular guiada por videolaparoscopia, procedimentos estes que foram repetidos mais duas vezes (sete e 14 dias depois). Foram encontradas alterações nas ovelhas em estresse calórico para todos os parâmetros clínicos avaliados (temperaturas retal e cutânea, frequências respiratórias e cardíacas e sudorese). Também foi encontrado maior média no número de folículos aspiráveis na primeira seção de aspiração para as ovelhas em conforto ( $P < 0,05$ ), e menor taxa de recuperação de complexos cumulus-oócito (CCOs), e conseqüentemente, menor média no número de CCOs ( $P < 0,05$ ) também na primeira seção de aspiração nas ovelhas do grupo calor ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, o estresse calórico reduz o número de folículos aspiráveis e a taxa de recuperação de complexos cumulus-oócito na primeira seção de aspiração após o estresse.

**Palavras chave:** aspiração, estresse calórico, folículos, oócito, ovino

#### **ABSTRACT**

Aiming to evaluate the clinical physiological follicular growth and recovery of cumulus oocyte complexes of sheep subjected to environmental heat stress and comfort, seven sheep were placed Santa Ines in climatic chamber, the following environmental conditions: comfort (24.4 °C and RH 68%) and heat (35.4 °C and 67.4% RH). After 30 days on these environmental conditions, these sheep had their clinical parameters assessed and evaluated and their ovarian follicles aspirated by ovum guided laparoscopic. These procedures were repeated two more times (seven and 14 days after). Changes were found in sheep under heat stress for all evaluated parameters (skin and rectal temperatures, respiratory and cardiac frequencies and sweating). It has also been found in higher mean number of follicles Inhalable suction in the first section in comfort for sheep ( $P < 0.05$ ) and lower recovery rate of cumulus-oocyte complexes (COCs), and therefore the lower average number of COC ( $P < 0.05$ ) also in the first section of the vacuum heat sheep group ( $P < 0.05$ ). In conclusion, heat stress reduces the number of follicles Inhalable and recovery rate of cumulus-oocyte aspiration in the first section after the stress.

**Keywords:** aspiration, follicle, heat stress, oocyte, sheep

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a ovinocultura tem se intensificado nos últimos anos, ocupando posição de destaque entre os diversos ramos do agronegócio, principalmente por suas características de ciclo produtivo curto com consequente giro financeiro rápido e boa adaptabilidade animal (Deminiçis et al., 2008). Entretanto, a maior parte dos rebanhos nacionais está instalada em regiões adversas, muitas vezes, em situações inóspitas, tanto nutricionais como ambientais. Essas condições de criação geralmente prejudicam a eficiência produtiva e reprodutiva destes animais (Bezerra et al., 2008).

O clima é um dos componentes ambientais que exerce efeito mais pronunciado sobre o bem-estar animal e, por consequência, sobre a produção e reprodução. Portanto, é considerado fator regulador ou mesmo limitador da exploração animal para fins econômicos (Clemente e Borges, 2007).

O estresse térmico, resultante de altas temperaturas ambientais associadas à elevada umidade do ar, acarretam mudanças nos parâmetros clínicos fisiológicos e comportamentais dos animais (Cezar et al., 2003 e Oliveira et al., 2013), com alterações nas frequências cardíacas e respiratórias, temperaturas de superfície corporal e retal, além de aumento da sudorese pelos animais (Starling et al., 2002; Neiva et al., 2004; Gomes, 2011).

Em ovelhas, os estudos sobre os efeitos do estresse térmico sobre a função reprodutiva são limitados. No entanto, sabe-se que a eficiência reprodutiva dos ovinos é adversamente afetada pela hipertermia (Sawyer et al., 1979). Além disso, sabe-se também que altas temperaturas reduzem as taxas de fertilidade e alteram a duração da gestação, aumentam as taxas de aborto e absorção embrionária (Ingrain e Mount, 1975). O estresse térmico durante a fase

folicular em ovelhas, também leva à ovulação de oócitos com reduzida competência para desenvolver, afetando a qualidade do embrião (Naqvi et al., 2004).

Nesse contexto, este experimento teve como objetivo avaliar os parâmetros clínicos fisiológicos, o crescimento folicular induzido hormonalmente e a recuperação de complexos cumulus-oócito aspirados por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês mantidas em duas distintas condições ambientais (conforto e estresse térmico por calor) em câmara climatizada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e população experimental

Este experimento foi realizado na câmara climatizada do laboratório de calorimetria e metabolismo animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

Foram utilizadas 14 ovelhas da raça Santa Inês com escore de condição corporal variando de 2,5 a 3, todas previamente selecionadas por exame clínico e ginecológico, distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento.

### Manejo e estratégia de alimentação

Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com 2,5% do peso vivo, de matéria seca (MS) na dieta, à base de 70% de feno de *Tifton 85* e 30% de concentrado. O concentrado fornecido foi constituído de 70% de fubá de milho e 30% de farelo de soja.

Para avaliação das diferentes condições de ambiência sobre os parâmetros clínicos, crescimento folicular e taxa de recuperação dos complexos cumulus-oócito aspirados por videolaparoscopia, os animais foram

divididos em grupos de acordo com os seguintes tratamentos:

Tratamento 1: Temperatura de 25 °C e umidade relativa de 70% (Grupo conforto);

Tratamento 2: Temperatura de 35 °C e umidade relativa de 70% (Grupo calor).

O procedimento experimental foi composto de um período de adaptação de 14 dias, no qual todos os animais foram mantidos em condições de termoneutralidade, para se ajustarem as condições físicas, de alimentação e da câmara climatizada. Após este período, os animais foram submetidos aos tratamentos, permanecendo nas condições de cada tratamento por um período de sete semanas.

#### Obtenção das variáveis climáticas

Para controle dos tratamentos empregados, as variáveis climáticas, temperatura do ar (°C) e umidade relativa do ar (%) foram monitoradas através de termohigrômetros digitais distribuídos em quatro pontos distintos dentro da câmara climatizada, controlada por painéis digitais de temperatura, umidade e renovação da massa de ar. Essas variáveis foram registradas diariamente durante todo experimento (Tabela 1).

**Tabela 1.** Média das condições climáticas nos diferentes tratamentos empregados na câmara climatizada

Variáveis	Tratamentos	
	Conforto	Calor
Ta (°C)	24,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	35,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
UR (%)	68,0 ± 0,9	67,4 ± 2,4
ITU	72,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	87,0 ± 0,3 <sup>a</sup>

(a, b) Letras diferentes na mesma linha demonstra diferença significativa entre as épocas (P < 0,05). Ta = temperatura do ar; UR = umidade relativa; ITU = índice de temperatura e umidade. Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

#### Mensurações das variáveis clínicas

Os parâmetros clínicos foram avaliados durante dois dias consecutivos, na semana que se iniciou as aspirações, e em dois momentos, as 9h e 30min e as 14h e 30min do dia. Para a determinação da temperatura retal (TR), utilizou-se um termômetro digital com precisão de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , introduzido no reto do animal por um minuto. A frequência respiratória (FR) foi obtida de forma visual, observando-se por 30 segundos os movimentos respiratórios, com a visualização concentrada na região do flanco. Foram feitas duas contagens em cada animal, cada uma por um observador diferente, e destas contagens foi calculada a média, sendo posteriormente multiplicada por dois, totalizando assim o número de movimentos respiratórios por minuto (mov/min).

A frequência cardíaca (FC) foi aferida utilizando um estetoscópio (BD DUO® – Sonic MDF 747) e um cronômetro digital, de acordo com o método descrito por Baccari Júnior (1990).

A temperatura cutânea (TC) foi obtida através da média de quatro aferições, realizadas em pontos distintos do animal: frente, cernelha, flanco e jarrete. Estas medidas foram realizadas com o auxílio de um termômetro infravermelho digital portátil, de mira laser e 99% de precisão (MT-350, MINIPA), a uma distância de aproximadamente 50 centímetros do animal.

Para a realização do teste de sudorese, segundo a metodologia descrita por Silva (2000), preparou-se discos de 0,5 cm de diâmetro de papel de cromatografia tipo Whatmam, N° 1, embebidos em solução de cloreto de cobalto hexa-hidratado a 10%, e secos ao ar livre. Em seguida, estes foram acondicionados em estufa entre 80°C e 90°C até atingir a cor azul violácea. Após a secagem, três discos de cada vez foram

fixados com fita adesiva transparente a uma lâmina de vidro e conservados em dessecador contendo sílica. Todos os discos foram preparados, em média, duas horas antes de sua utilização.

No momento da realização do teste, retirou-se a fita adesiva da lâmina de vidro e a fixou com os discos voltados para a pele do animal (previamente tricotomizada, limpa e seca com álcool 70% e éter etílico). Após a fixação da fita com os discos na 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. Os valores registrados representaram as médias dos tempos registrados nos três discos, em seguida, aplicados na seguinte fórmula (Silva, 2000):

$$TS = 38446,6019 / t$$

Sendo:

TS = a taxa de sudação em gramas/metro quadrado/hora ( $g/m^2/h$ ); e

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

## Estimulação hormonal

Após período de 20 dias nas condições experimentais, cada ovelha recebeu uma esponja intravaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (PROGESPON<sup>®</sup>), momento este considerado como dia 0 (D0) do protocolo, e aplicação via intra muscular (IM) de 75µg de D-cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>), análogo de prostaglandina F2α no D7. Esta esponja foi substituída no D10 (dia da primeira seção de aspiração) e removida no momento da terceira e última seção de aspiração de cada tratamento.

O desenvolvimento folicular foi estimulado pela administração IM ao mesmo tempo por dose única de 70 mg de hormônio foliculo estimulante (FSH) (NIH-FSH-P1, Folltropin<sup>®</sup>), associado a 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novoromon<sup>®</sup> 5000). A primeira dose de FSH/eCG foi administrada no D8, 48 horas antes da primeira seção de aspiração (D10), repetindo-se estas aplicações sete e quatorze dias depois, para completar um total de três aspirações por ovelha, em cada tratamento (Figura 1).

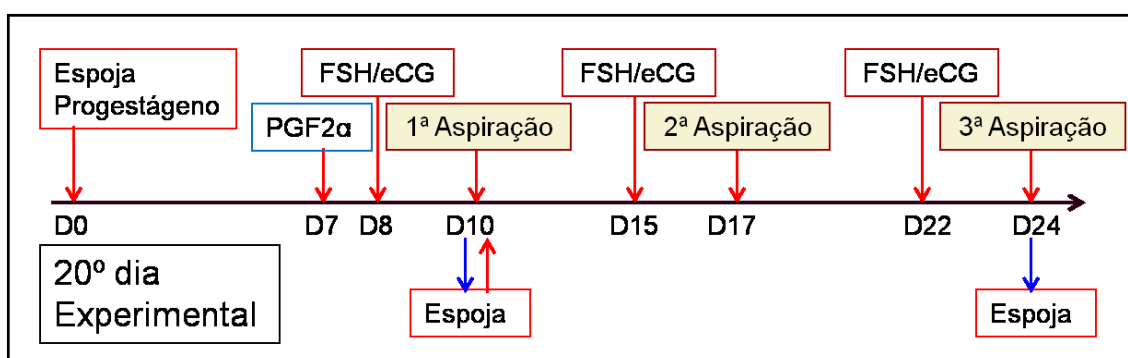


Figura 1. Esquema do protocolo utilizado para estimulação hormonal e aspiração folicular

## Preparo dos animais

Após jejum hídrico e alimentar de 24 horas, os animais foram submetidos à anestesia, a qual foi realizada através da administração IM de 0,2 mg/kg de cloridrato de xilazina

como medicação pré-anestésica (MPA) e posteriormente, indução com 2mg/kg de ketamina, via intravenosa (IV). A manutenção da anestesia foi realizada com repiques de 1mg/kg IV de ketamina, sempre que necessário até o fim da cirurgia.

Após a indução anestésica, nos animais já tricotomizados, realizou-se a antisepsia (iodo dergemante, iodo povidona e álcool 70%) da região abdominal e a anestesia local infiltrativa com 1,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2% nos botões de acesso laparoscópicos, sendo 0,5 mL no tecido sub-cutâneo e 0,5 mL intramuscular.

#### População e aspiração folicular

Com os animais sob anestesia geral e analgesia local, as fêmeas foram posicionadas em ângulo de 45°, e com o auxílio de um bisturi fez-se incisão cutânea na linha média 20 cm cranial ao úbere, para facilitar a introdução do trocater (cinco milímetros de diâmetro), com válvulas para insuflação, estabelecendo o pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>. Por este trocater foi introduzido o laparoscópio conectado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o interior da cavidade, sendo a imagem visualizada no monitor; seguindo-se a introdução video-assistida do segundo trocater, 10 a 12 cm cranial ao úbere e cinco centímetros à direita da linha média, e o terceiro trocater em posição antimérica ao primeiro.

Sequencialmente, foi introduzido pelo segundo trocater a pinça atraumática (Babcock) que permitiu a manipulação do útero, tubas e ovários. Após visualização e individualização destes, cada ovário foi fixado com a pinça pelo mesovário, evitando sempre lesar qualquer estrutura. Previamente à punção folicular de cada ovário, estes foram examinados e todos os folículos visíveis na superfície do ovário foram contados e classificados em pequenos (até 2mm), médios (2 - 5mm) e grandes (maior que 5mm).

Em seguida, foi introduzida a guia de aspiração conectada a uma agulha na cavidade pelo terceiro trocater, próximo ao local onde se encontrava o ovário fixado. A punção foi realizada movimentando os

ovários em diferentes posições com a pinça de manipulação atraumática. A agulha foi inicialmente colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permitiu as perfurações dos folículos nas suas extremidades. Uma vez inserida no folículo, a agulha foi cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo fosse aspirado. A pressão do vácuo utilizada foi em média 60 mmHg.

Para realização das punções, utilizou-se um sistema de aspiração com lúmen simples, composto por um circuito de teflon de 50 cm de comprimento, conectado de um lado, a uma agulha própria para aspiração de 22G com bisel curto (WTA<sup>®</sup>), e do outro, a uma rolha de silicone, a qual foi acoplada ao tubo de colheita (50 mL). O vácuo utilizado foi produzido por uma bomba de aspiração (Rocketmedical<sup>®</sup>). Previamente à aspiração dos complexos cumulus-oócito (CCOs), realizou-se lavagem interna da linha de aspiração com o meio de colheita (Anexo I), deixando ao final deste procedimento aproximadamente 2,5 mL deste meio para receber os oócitos.

Ao término das aspirações os ovários foram lavados com aproximadamente 150 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) com heparina (5UI/mL), para remoção de coágulos da superfície, minimizando a formação de aderências. As dermorrafias foram realizadas com pontos tipo Wolf, com fios de sutura mononylon 0-0. Ato contínuo se procedeu à limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica, aplicação de spray repelente/cicatrizante a base de prata ao redor da ferida cirúrgica e aplicação IM de oxitetraciclina (20 mg/Kg).

Todas as classificações e punções foram realizadas pelo mesmo operador, o qual foi previamente treinado. Os complexos cumulus-oócito foram recuperados e avaliados com auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon<sup>®</sup>) em aumento de 40x.

## Análises Estatísticas

Este experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, contendo sete repetições para as avaliações dos parâmetros fisiológicos e para as respostas reprodutivas.

Os parâmetros clínicos fisiológicos e os dados climáticos foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e os resultados obtidos tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Já as variáveis que não apresentaram distribuição normal, mesmo após transformação, foram submetidas à análise não-paramétrica, utilizando-se o teste de Mann-Whitney, também a 5% de probabilidade.

O número de folículos e complexos cumulus oócito aspirados também foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Como apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando a ocorrência dos erros (a) e (b), referentes à parcela (conforto e calor) e subparcelas (três seções de estimulação/aspiração), respectivamente. Os resultados obtidos tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Já a população folicular ovariana e as taxas de recuperação foram avaliadas através de tabelas de contingência (2 x 3), com dois ambientes e três tamanhos foliculares ou três seções de aspiração. Os resultados observados tiveram suas proporções avaliadas pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade.

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas estatísticos ASSISTAT v. 3.6 Beta (2011) e GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros fisiológicos

Os resultados encontrados para frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC), temperatura cutânea (TC), temperatura retal (TR) e produção de suor (sudorese) estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Médias da frequência respiratória (mov./min.), frequência cardíaca (bat./min.), temperatura cutânea (°C), temperatura retal (°C) e sudorese (g/m<sup>2</sup>/h) de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada

Parâmetros fisiológicos	Tratamentos	
	Conforto	Calor
FR (mov./min.)**	20,0 ± 3,0 <sup>b</sup>	115,7 ± 17,6 <sup>a</sup>
FC (bat./min.)*	67,4 ± 7,0 <sup>b</sup>	78,7 ± 9,2 <sup>a</sup>
TC (°C)**	29,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	36,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
TR (°C)**	38,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	38,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
Sudação(g/m <sup>2</sup> /h)*	88,1±27,6 <sup>b</sup>	227,1±79,1 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste Tukey (P <0,05). \*\*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Many-Whitney (P <0,05). FR = frequência respiratória; FC = frequência cardíaca; TC = temperatura cutânea; TR = temperatura retal; Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

A FR nos ovinos é considerada normal quando apresenta valor médio de 25 movimentos respiratórios por minuto, podendo esses valores variarem entre 16 e 34 mov/min (Reece, 1996). A média da FR obtida nas ovelhas do grupo conforto (20,0 ± 3,0 mov/min) encontra-se nessa normalidade. Por outro lado, a média da FR apresentada pelas ovelhas do grupo calor (115,7 ± 17,6 mov/min) foi significativamente maior (P <0,05) que a do

grupo conforto. De acordo com a classificação de Silanikove et al. (2000), FR de 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 120 mov/min caracteriza estresse baixo, médio-alto e alto respectivamente, o que possibilita inferir que as ovelhas do grupo calor encontravam-se em situação de estresse calórico alto.

Os animais utilizam o aumento da frequência respiratória como uma forma de manter a temperatura corporal dentro do patamar fisiológico, por meio da evapotranspiração pulmonar (Martins Júnior et al., 2007). Segundo Starling et al. (2002), o mecanismo de perda de calor mais eficaz é o evaporativo, por não depender do diferencial de temperatura entre o organismo e a atmosfera. A evaporação respiratória é um mecanismo fisiológico utilizado pelos ovinos em respostas intensas por períodos curtos (Silva e Starling, 2003). Essa eficiência em perder calor por via evaporativa tem permitido aos ovinos adaptarem-se muito bem a locais quentes do planeta.

A frequência cardíaca do grupo de animais submetidos às condições de estresse térmico foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que a daqueles do grupo submetido às condições de conforto (Tabela 2), estando às médias de ambos os grupos dentro da normalidade da espécie, compreendidos entre 70-90 bat/min (Radostits et al., 2002; Diffay et al., 2004).

Tanto no experimento de Faria (2010), trabalhando com ovelhas Santa Inês a campo, quanto nos de Ferreira (2005) e de Andrade (2011), trabalhando em câmara climatizada, foi observado aumento na frequência cardíaca dos animais que estavam em condição de estresse pelo calor. A temperatura cutânea ou temperatura de superfície do animal, também apresentou médias superiores ( $P < 0,05$ ) nas ovelhas submetidas ao estresse térmico. A temperatura corporal é o resultado da diferença entre energia térmica produzida

mais a recebida pelo organismo animal e a energia térmica dissipada para o meio (Brosh et al., 1998).

Tanto o redirecionamento do fluxo sanguíneo para a superfície corporal, quanto a vasodilatação periférica aumentam a temperatura da pele, e facilitam a dissipação de calor por mecanismos não evaporativos (condução, convecção e radiação). Quando a temperatura do ar se eleva, a diferença térmica entre a superfície do corpo e o ambiente decresce, dificultando a dissipação de calor, tendo o animal que lançar mão de mecanismos evaporativos (sudorese e/ou frequência respiratória) para perder calor (Souza et al., 2008).

A média de sudorese das ovelhas foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre os grupos conforto e calor (Tabela 2). Gomes (2011), trabalhando com ovelhas da raça Santa Inês, encontrou diferença entre as médias de sudorese quando comparados os grupos conforto (24°C e 65% UR) e estresse (34°C e 50% UR) em seu experimento, obtendo valores entre 52,43 e 125,38 g/m<sup>2</sup>/h, respectivamente. Trabalhando com ovinos deslançados em temperaturas de 25 e 35°C, Silva et al. (1990), encontraram maiores valores de sudorese nos animais que estavam na temperatura mais elevada, mas atribuíram a essa diferença, aos maiores valores encontrados para umidade relativa do ar.

A sudorese é uma estratégia para manutenção da temperatura corporal controlada pelo hipotálamo. O suor, nada mais é que a perda de água e sais minerais que, quando evapora na superfície da pele, auxilia na perda de calor (Pereira, 2005). De acordo com Faria (2010), a perda de calor latente evaporativo, através das glândulas sudoríparas, é um dos mecanismos de adaptação ao estresse calórico dos animais podendo ser afetado pelo ambiente. Quando o meio se apresenta

seco e quente, ocorre sudorese mais intensa por parte do animal. Porém, quando a temperatura e a umidade relativa do ar estão altas, a perda de calor pela sudorese não consegue controlar a homeotermia, fazendo com que o animal lance mão de outros meios termorregulatórios mais eficientes, tais como a evaporação respiratória.

A temperatura retal é o parâmetro clínico fisiológico que reflete o real equilíbrio térmico corporal, entre a quantidade de calor produzida e recebida, e a dissipada ao meio externo (Ferreira, 2005 e Faria, 2010). No presente trabalho, a temperatura retal sofreu influência dos tratamentos térmicos (Tabela 2), sendo maior no grupo de ovelhas em estresse térmico calórico. Contudo, seus valores encontram-se dentro do intervalo tido como normal, que é de 38°C a 40,5°C, de acordo com Kolb (1987).

A elevação dos parâmetros clínicos dos animais, nas condições ambientais impostas pelo tratamento calor, principalmente a elevação da frequência respiratória (115,7±17,6 mov/min), a qual ficou bem acima da normalidade da espécie (16 - 34 mov/min), sugere que as condições climáticas de ITU 87 encontradas neste experimento promoveram estresse calórico nos animais estudados, suplantando a ótima capacidade adaptativa de ovinos nativos deslançados, como descrita por Neiva et al. (2004) e Ribeiro et al. (2009).

### Aspiração e classificação dos folículos

As condições ambientais de conforto e estresse térmico por calor não influenciaram a média de folículos aspiráveis por ovelha através da técnica de videolaparoscopia ( $P > 0,05$ ), com 13,9±3,9 e 11,90±5,6 folículos por seção de estimulação/aspiração, respectivamente. Da mesma forma, as repetições das estimulações hormonais, também não influenciaram nas médias de folículos aspiráveis ( $P > 0,05$ ), nos momentos das

seções de aspiração, 13,6±5,3; 12,3±4,4 e 12,8±5,2 na primeira, segunda e terceira seção de aspiração, respectivamente.

Gibbons et al. (2007), testando estimulação hormonal “oneshot” (aplicação única) de FSH / eCG em ovelhas Merino Australiano em quatro seções de aspiração subsequentes, também não encontraram influência do número de seções de aspirações sobre a média de folículos aspirados, com média de 14,4±1,0 folículos/ovelha/seção de aspiração.

Entretanto, neste experimento, ocorreu interação entre as condições ambientais e a ordem de estimulação hormonal ( $P < 0,05$ ), com maior média de folículos aspiráveis nas ovelhas do grupo conforto, na primeira estimulação hormonal (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito da ordem de estimulação hormonal, na média de folículos visíveis no ovário no momento da aspiração videolaparoscópica das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições ambientais de conforto e calor

Ordem	Tratamentos	
	Conforto	Calor
1ª Asp.	15,9 ± 4,0 <sup>aA</sup>	11,4 ± 5,7 <sup>aB</sup>
2ª Asp.	13,0 ± 3,1 <sup>ba</sup>	11,6 ± 5,6 <sup>aA</sup>
3ª Asp.	12,9 ± 4,2 <sup>ba</sup>	12,7 ± 6,3 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ( $P < 0,05$ ). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

Comparando os efeitos dos tratamentos ambientais (conforto e calor) na população folicular, dentro de cada ordem de estimulação/aspiração, verificou-se que os tratamentos ambientais não influenciaram a proporção de folículos pequenos, médios e grandes ( $P > 0,05$ ), tanto na primeira, quanto na segunda seção de estimulação/aspiração folicular (Tabela 4). Contudo, os tratamentos ambientais influenciaram a população de folículos da terceira aspiração (Tabela 4), com maior proporção de

foliculos pequenos nas ovelhas em estresse

( $P < 0,05$ ), comparados as em conforto.

**Tabela 4.** Comparação entre as diferentes condições ambientais (conforto e calor) na frequência de foliculos presentes nos ovários, dentro de cada categoria folicular: pequenos ( $< 2\text{mm}$ ), médios ( $> 2 < 5\text{mm}$ ) e grandes ( $> 5\text{mm}$ ); e nas distintas ordens de aspiração: primeira, segunda e terceira aspiração folicular

Ordem de Aspiração	Foliculos	Tratamentos	
		Conforto	Calor
1ª Aspiração	Pequenos (%)	28,8 (32/111)	25,0 (20/80)
	Médios (%)	49,6 (55/111)	45,0 (36/80)
	Grandes (%)	21,6 (24/111)	30,0 (24/80)
2ª Aspiração	Pequenos (%)	48,3 (44/91)	42,0 (34/81)
	Médios (%)	40,7 (37/91)	46,9 (38/81)
	Grandes (%)	11,0 (10/91)	11,1 (9/81)
3ª Aspiração	Pequenos (%)	44,4 (40/90) <sup>B</sup>	59,5 (53/89) <sup>A</sup>
	Médios (%)	45,6 (41/90)	31,5 (28/89)
	Grandes (%)	10,0 (9/90)	9,0 (8/89)

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Qui-quadrado, ( $P < 0,05$ ). Conforto =  $24,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e UR de 68%; Calor =  $35,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e UR de 67,4%.

A distribuição da população folicular dentro de cada seção de estimulação/aspiração, de cada tratamento ambiental (conforto e calor), está descritos na tabela 5. Nesta, pode-se verificar que na primeira seção de estimulação/aspiração, a proporção de foliculos médios foi maior que as proporções dos foliculos pequenos e grandes em ambas as condições ambientais ( $P < 0,05$ ). Na segunda estimulação/aspiração, tanto no grupo conforto, quanto no grupo calor, ocorreu menor proporção de foliculos grandes, comparados à proporção de foliculos pequenos e médios ( $P < 0,05$ ). Entretanto, na terceira estimulação/aspiração, a população folicular apresentou proporções diferentes entre os tratamentos. No grupo conforto, a terceira seção de estimulação/aspiração, apresentou população folicular semelhante a da segunda seção, com menor proporção de foliculos grandes ( $P < 0,05$ ). Já no grupo de ovelhas do tratamento calor, a proporção de foliculos foi diferente entre os três tamanhos, com maior porcentagem de

foliculos pequenos e menor de foliculos grandes ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do efeito da ordem de estimulação/aspiração em cada grupo da população folicular, de acordo com os tratamentos ambientais, mostraram que a porcentagem de foliculos médios presentes nos ovários no momento das aspirações, não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) entre as três seções em ambas as condições ambientais. Já a porcentagem de foliculos grandes, também em ambas as condições ambientais, foi maior na primeira seção ( $P < 0,05$ ), e não apresentou diferença entre a segunda e terceira estimulação/aspiração ( $P > 0,05$ ). Em contrapartida, a população de foliculos pequenos foi diferente em cada tratamento ambiental, de forma que, no grupo conforto, a porcentagem de foliculos pequenos foi menor na primeira seção de estimulação/aspiração ( $P < 0,05$ ), e não apresentou diferença entre a segunda e a terceira ( $P > 0,05$ ). Enquanto que no grupo estressado caloricamente, ocorreu diferença entre as porcentagens de foliculos pequenos

nas três seções (P <0,05), com menor porcentagem na primeira, e maior

porcentagem na terceira e última seção de estimulação/aspiração folicular (Tabela 5).

**Tabela 5.** Proporção de folículos pequenos (< 2 mm), médios (> 2 < 5 mm) e grandes (> 5 mm) presentes nos ovários, no momento da 1ª, 2ª e 3ª aspiração das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições de conforto e de calor

Ambiente	Folículos	Ordem de Aspiração		
		1ª Asp. (%)	2ª Asp. (%)	3ª Asp. (%)
Conforto	Pequenos (< 2 mm)	28,8 (32/111) <sup>bB</sup>	48,3 (44/91) <sup>aA</sup>	44,4 (40/90) <sup>aA</sup>
	Médios (> 2 < 5 mm)	49,6 (55/111) <sup>aA</sup>	40,7 (37/91) <sup>aA</sup>	45,6 (41/90) <sup>aA</sup>
	Grandes (> 5mm)	21,6 (24/111) <sup>bA</sup>	11,0 (10/91) <sup>bB</sup>	10,0 (9/90) <sup>bB</sup>

Ambiente	Folículos	Ordem de Aspiração		
		1ª Asp. (%)	2ª Asp. (%)	3ª Asp. (%)
Calor	Pequenos (< 2 mm)	25,0 (20/80) <sup>bC</sup>	42,0 (34/81) <sup>aB</sup>	59,5 (53/89) <sup>aA</sup>
	Médios (> 2 < 5 mm)	45,0 (36/80) <sup>aA</sup>	46,9 (38/81) <sup>aA</sup>	31,5 (28/89) <sup>bA</sup>
	Grandes (> 5 mm)	30,0 (24/80) <sup>bA</sup>	11,1 (9/81) <sup>bB</sup>	9,0 (8/89) <sup>cB</sup>

Médias seguidas de letras diferentes minúscula na coluna, dentro de cada condição ambiental e maiúscula na linha diferem pelo teste de Qui-quadrado, (P <0,05). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

De acordo com Badinga et al. (1993), o crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos podem ser ou não, afetados pelo estresse calórico materno. Mas quando afetados, os efeitos do estresse térmico sobre a função folicular pode envolver mudanças tanto no âmbito folicular, quanto na produção dos hormônios pituitários.

A condição de estresse ambiental proporcionada pelo calor (35,4 °C e 67,4% de UR) influenciou na terceira e última seção de estimulação. Nesta, a maior porcentagem de folículos pequenos no grupo calor (Tabela 4), possivelmente ocorreu devido à menor resposta das células foliculares a ação do FSH exógeno aplicado. De acordo com Guzeloglu et al. (2001), em condições de estresse calórico, o número de células da granulosa viáveis nos folículos são reduzidos. Além disso, o estresse calórico também inibe o desenvolvimento folicular através da redução do número de receptores de FSH nas células da granulosa de folículos em crescimento, ocasionando a diminuição dos níveis de estrogênio, e aumento da atresia

folicular (Shimizu et al., 2005). Essa seria uma possível explicação para menor média de folículos visualizados no grupo de ovelhas estressadas por calor durante a primeira seção de estimulação/aspiração (Tabela 3).

Ozawa et al. (2005) verificaram que o estresse térmico por calor durante a fase de recrutamento folicular, compromete severamente o crescimento de folículos de tamanho médio (3,5 – 5 mm) até a ovulação, e que esses efeitos estão associados à redução do número de receptores de LH e da atividade de síntese de estradiol, pela supressão da atividade da aromatase nos folículos de cabras expostas a estresse térmico (36°C e 70% de umidade).

Experimento com cultura de células foliculares de bovinos reduziu a produção de esteróides, quando colocadas em temperaturas elevadas (Wolfenson et al., 1997; Bridges et al., 2005). A produção de esteróides por células da teca e granulosa cultivadas também foram baixas, quando estas células foram obtidas a partir de vacas

expostas ao calor durante 20-26 dias antes da coleta (Roth et al., 2001).

A maior população de folículos grandes na primeira estimulação, quando comparado a segunda e a terceira estimulações (Tabela 7), pode ser explicada pelo protocolo de sincronização utilizado, onde a população folicular existente, e a fase da onda crescimento folicular no início do tratamento com as gonadotrofinas eram desconhecidas. Como a ação do FSH exógeno aplicado não faz diferenciação entre os folículos a serem recrutados e aqueles que já iniciaram a onda de crescimento folicular, este acaba estimulando o crescimento dos dois tipos de folículos, tendo como consequência, maior número de folículos grandes, no momento da primeira aspiração. Isso, porque o FSH exógeno tem como função, anular a supressão do folículo dominante sobre os subordinados.

O hormônio folículo-estimulante (FSH), quando usado para a indução de múltiplas ovulações em ovelhas, geralmente é administrado em doses fracionadas, duas vezes ao dia, durante os últimos três ou quatro dias do tratamento com progestágeno (Baril et al., 1993). Este fracionamento é necessário por causa da meia-vida curta do FSH. Os protocolos estimulatórios que combinam alta dose (60-80 mg) de FSH acompanhada por baixa dose (200-300 UI) de eCG, administradas num mesmo momento, proporcionam desenvolvimento folicular e quantidade de oócitos colhidos similar àqueles obtidos em resposta a múltiplas injeções de FSH isoladamente (Batt et al., 1993; Baldassarre et al., 1996). Assim, a alta dose de FSH aplicada realiza o recrutamento folicular, mas não sustenta o desenvolvimento dos folículos ainda responsivos ao FSH (Stubblings et al., 1993). Então entra o eCG, cuja meia-vida de ação é longa (Hafez, 1995), possibilitando a continuação do crescimento folicular iniciado pela alta dose

de FSH. A utilização da aplicação em dose única ao invés das múltiplas e fracionadas é preferível devido a sua praticidade, uma vez que os resultados finais são semelhantes.

No grupo conforto, as porcentagens de folículos pequenos e médios foram semelhantes tanto na segunda, quanto na terceira seção, e entre elas. Isso mostra, que o recrutamento de folículos, estimulados pela aplicação exógena de FSH, não foi influenciado pelas repetidas seções de estimulação/aspiração.

O tempo entre a estimulação ovariana e o momento da aspiração folicular é outro fator determinante, melhores resultados são obtidos quando a aspiração dos folículos ocorre 36-48 horas após a aplicação de gonadotrofina, sem remover o dispositivo vaginal de liberação de progesterona, que bloqueia a ovulação (Baldassarre et al., 2002, 2003; Morton et al., 2005; Freitas e Melo, 2010).

#### **Recuperação dos complexos cumulus-oócito (CCOs)**

Neste experimento, não houve diferença na taxa de recuperação de oócitos entre ovelhas do grupo conforto e calor ( $P > 0,05$ ), com taxas médias de recuperação total de 54,8% x 51,0%, respectivamente. Todavia, dentro do grupo de ovelhas sob estresse calórico, a taxa de recuperação de CCOs obtida na primeira aspiração foi menor que na terceira aspiração. Esta diferença pode estar relacionada à maior proporção de folículos grandes na primeira seção de aspiração, comparadas a segunda e terceira. Folículos grandes, pré-ovulatórios ( $>5\text{mm}$ ), necessitam de maior pressão de aspiração e cânula de aspiração de maior diâmetro, uma vez que, sob estímulo gonadotrófico, próximo à ovulação, ocorre síntese de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, a qual confere ao fluido folicular aspecto viscoso, dificultando a passagem do CCOs em cânulas de menor diâmetro e sob baixa

pressão de aspiração (Crocomo et al., 2012).

**Tabela 6.** Efeito da sequência de aspiração na taxa de recuperação dos CCOs aspirados por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada

TR	Tratamentos	
	Conforto	Calor
1ª Asp.	51,4 (57/111)	39,1 (27/69) <sup>b</sup>
2ª Asp.	54,9 (50/91)	51,9 (42/81) <sup>ab</sup>
3ª Asp.	58,9 (53/90)	59,6 (53/89) <sup>a</sup>

Percentagens seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade. TR = taxa de recuperação; Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

A média de complexos cumulus-oócito (CCOs) aspirados na primeira seção de aspiração dos animais submetidos ao tratamento calor foi menor que a média de CCOs aspirados nos animais do tratamento conforto ( $P < 0,05$ ), na mesma seção de aspiração (Tabela 7). Além disso, no grupo de ovelhas sob estresse calórico, a média de CCOs obtidos na primeira aspiração foi menor que na terceira aspiração. Esta menor média de CCOs recuperados pelo grupo calor na primeira aspiração pode ser justificada por duas respostas encontradas neste trabalho. Menor média de folículos aspirados (Tabela 3), e menor taxa de recuperação (Tabela 6) nas ovelhas do grupo calor, quando comparada as ovelhas do grupo conforto ou aspiradas na última seção de aspiração.

Resultados obtidos em estudos atuais, utilizando a aspiração por laparoscopia ou videolaparoscopia após a administração em dose única de FSH/eCG foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, com médias de 11,4 a 16,3 folículos aspiráveis por ovelha, e taxas de recuperação de CCOs/folículos aspirados entre 50% e 87% (Morton et al., 2005; Gibbons et al., 2007; Basso, 2008; Max, 2011 e Lahoz et al.,

2013). O trabalho com maior taxa de recuperação foi o descrito por Max (2011). Porém, essa diferença de resultados provavelmente deve ser relativa ao uso de técnicas e equipamentos distintos, não sendo possível, portanto, fazer uma comparação fiel entre as taxas obtidas nos experimentos.

**Tabela 7.** Efeito da sequência de aspiração na média do número de CCOs obtidos por aspiração videolaparoscópica de ovelhas Santa Inês mantidas nas duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada

Ordem de Aspiração	Tratamentos	
	Conforto	Calor
1ª Asp.	8,1 ± 2,8 <sup>A</sup>	4,0 ± 1,5 <sup>Bb</sup>
2ª Asp.	7,1 ± 3,4	6,0 ± 4,0 <sup>ab</sup>
3ª Asp.	7,6 ± 2,2	7,6 ± 2,9 <sup>a</sup>

As médias seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

O fluxo e a pressão de aspiração, mensurados por mL água/ minuto e mmHg, respectivamente, consistem em importantes aspectos físicos da aspiração folicular com agulha acoplada à bomba a vácuo e estão diretamente relacionados à eficiência da recuperação de CCOs (Crocomo et al., 2012). As pressões de aspiração com bomba a vácuo consideradas ótimas para ovelhas, variaram de 50 a 70 mmHg (Baldassarre et al., 2003). Pressões mais baixas (25 mmHg) resultam em menores taxas de recuperação, enquanto que pressões mais altas (100 mmHg), resultam em maiores taxas de recuperação, contudo, menor proporção de CCOs de boa qualidade (Alberio et al., 2002 e Morton et al., 2008).

## CONCLUSÕES

O estresse calórico em ovelhas Santa Inês promove redução do número de folículos aspiráveis e da taxa de recuperação de complexos cumulus-oócito na primeira seção de aspiração.

O estresse calórico e o número de repetições de aspiração em ovelhas Santa Inês também reduz o número de folículos em crescimento a cada repetição de aspiração semanal, levando ao surgimento de maior proporção de folículos pequenos a partir da terceira seção de aspiração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A. et al. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Rum. Res.*, v.46, p.81–87, 2002.
- ANDRADE, P. A. D. *Efeito do estresse calórico e do milho expandido em parâmetros digestivos e fisiológicos em ovinos*. 2011. 155p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.
- BACCARI JUNIOR, F. *Métodos e técnicas de avaliação da adaptabilidade dos animais às condições tropicais*. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL NOS TRÓPICOS: PEQUENOS E GRANDES RUMINANTES, 1., 1990, Sobral, CE. *Anais...* Sobral: Embrapa-CNPC, 1990. p.9-17.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.39, p.797–810, 1993.
- BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. et al. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.35, p.145-150, 1994.
- BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G. et al. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v.45, p.707–717, 1996.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*, v.57, p.275–284, 2002.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N. et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v.56, p.831–839, 2003.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. *Manuel de formation pratique pour La transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre*. Rome: FAO, 1993. 183 p.
- BATT, P.A.; KILLEEN, I.D.; CAMERON, A.W.N. Use of single or multiple injections of FSH in embryo collection programmes in goats. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.5, n.1, p.49-56, 1993.
- BASSO, C. A.; MARTINS, J. F. P.; FERREIRA, C. R.. Produção in vitro de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. *O Embrião*, v.38, p.08-11, 2008. Disponível em: <http://www.sbte.org.br/oembriao>
- BEZERRA, L.R. et al. Perfil hematológico de cabras clinicamente sadias criadas no

- Cariri paraibano. *Ciênc. Agrotec.*, v.32, n.3, p.955-960, 2008.
- 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. Endoc.*, v.29, p.508-522, 2005.
- BROSH, A.; AHARONI, Y.; DEGEN, A. A. et al. Effects of solar radiation, dietary energy, and time of feeding on thermoregulatory responses and energy balance in cattle in a hot environment. *J. Anim. Sci.*, v.76, n.6, p.2671-2677, 1998.
- CEZAR, M.F.; SOUZA, B.B.; SOUZA, W.H. et al. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. *Ciênc. Agrotec.*, v.28, n.3, p.614-620, 2004.
- CLEMENTE, C. A. A.; BORGES, I. *Aspectos do estresse calórico na reprodução de ovelhas* In: SEMINÁRIOS DA PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA, 2007, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2007. CD ROM.
- CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM ALVARENGA, F. C. et al. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.36, n.1, p.25-31, 2012.
- DEMINICIS B. B.; LIMA L. C. O.; ARAÚJO S. A. C. et al. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. *Pubvet*, v.2, p.1-19, 2008.
- DIFFAY, B. C.; MCKENZIE, D.; WOLF, C.; et al. *Abordagem e exame de ovinos e caprinos*. In: Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2004. 513p.
- FARIA, W.G. *Aspectos fisiológicos de ovelhas Santa Inês alimentadas com distintas dietas durante dois períodos climáticos em Pedro Leopoldo-MG*. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.
- FERREIRA, F. *Avaliação clínico-laboratorial de bovinos submetidos ao estresse calórico*. 2005. 104p. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.
- FREITAS, V. J. F.; MELO, L. M. In vitro embryo production in small ruminants. *Rev Bras Zootec.*, v.39, p.409-413, 2010.
- GIBBONS, A.; PEREYRA BONNET, F.; CUETO, M. et al. A procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, p.423-426, 2007.
- GOMES, M. G. T. *Influência do ambiente térmico e de diferentes dietas na superovulação e nos parâmetros fisiológicos de ovelhas Santa Inês*. 2011. 243p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.
- GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J. D.; KASSA, T. et al. 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.
- HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582 p.
- INGRAM D. L.; MOUNT, L. E. *Man and Animals in Hot Environments*. Springer-Verlag, New York, 1975.
- KADZERE, M. R.; MURPHY, N.; SILANIKOVE, E. Heat stress in lactating

- dairy cows: a review. *Liv. Prod. Sci.*, v. 77, p. 59-91, 2002.
- KOLB, E. *Fisiologia veterinaria*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 1115p.
- LAHOZ, B.; ALABART, J. L.; FOLCH, J. et al. Influence of the FecX<sup>R</sup> Allele in Heterozygous Ewes on Follicular Population and Outcomes of IVP and ET using LOPU-Derived Oocytes. *Reprod Dom Anim*, 2013.
- MARTINS JÚNIOR, L. M.; COSTA, A. P. R.; RIBEIRO, D. M. M. et al. Respostas fisiológicas de caprinos Boer e Anglo-Nubiano em condições climáticas de meio-norte do Brasil. *Rev. Caat.*, v.20, n.2, p.1-7, 2007.
- MAX, M. C. *Produção in vitro de embriões na espécie ovina: Efeito do benzoato de estradiol na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias*. 2011, 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- MORTON, K. M.; DE GRAAF, S. P.; CAMPBELL, A. et al. Repeated oocyte pick up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.*, v.40, p.422–428, 2005.
- MORTON K. M.; MAXWELL W. M. C.; EVANS G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.106-110, 2008.
- NAQVI, S. M. K.; MAURYA, V. P.; GULYANI, R. et al. The Effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Rum. Res.*, v.55, p.57-63, 2004.
- NEIVA, J.N.M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S.H.N. et al. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região litorânea do nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.33, n.3, p.668-678, 2004.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirement of small ruminants*. Washington: National Academy Press, 2006.
- OLIVEIRA, F. A.; TURCO, S. H. N.; ARAÚJO, G. G. L. et al. Comportamento de ovinos da raça Santa Inês em ambientes com e sem disponibilidade de sombra. *R. Bras. Eng. Agríc. Amb.*, v.17, n.3, p.346–351, 2013.
- OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T. A. et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, v.129, p. 621–630, 2005.
- PEREIRA, J.C.C. *Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.
- PIERSON, J.; WANG, B.; NEVEU, N. et al. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.16, p.795–799, 2005.
- QUESADA, M.; McMANUS, C.; COUTO, F. A. D'A. Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no Distrito Federal. *Rev. Bras. Zoot.*, v.30, n.3 (sup 1), p.1021-1026, 2001.
- REECE, W.O.. *Respiração nos mamíferos*. In: DUKES, H. H.; SWENSON, M. J. *Fisiologia dos animais domésticos*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.199-205.

- RIBEIRO, G.C.; GOMES, M.G.T.; SILVA, V.; et al. Influencia de dietas com diferentes fontes de carboidratos e estresse térmico na taxa de sudação. In: 4º SINCORTE - *Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte*, 2009, João Pessoa - PB.
- RADOSTITTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. *Medicina veterinária: tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p. p. 1132-1136.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R. et al. 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. et al. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*, v.121, p.745–751, 2001
- SAWYER, G. J., The influence to radiant heat load in Merino ewes. II. The relative effects of heating before and after insemination. *Aust. J. Agr. Res.* 30, 1143–1149. 1979.
- SHIMIZU, T.; OHSHIMA, I.; OZAWA, M. et al. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction*, v.129, p.463–472, 2005.
- SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, v.67, p.1 - 18, 2000.
- SILVA, J. C. B.; OKABE, W. K.; TRALDI, A. S. From cattle to sheep: a view of the difficulties and success of commercial in vitro production of sheep embryos. *Anim. Reprod.*, v.9, n.3, p.195-200, 2012.
- SILVA, R.G. *Introdução à Bioclimatologia Animal*. São Paulo - SP: Editora Livraria Nobel, 2000.
- SILVA, R. G.; COSTA, M. J. R. P.; NOGUEIRA, O. R. *Sweating rate of heat stressed sheep*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOMETEOROLOGY, 12., 1990, Viena. Proceedings... Viena: International Society of Biometeorology, 1990. p.64.
- SILVA, R. G.; STARLING, J. M. C. Evaporação cutânea e respiratória em ovinos sob altas temperaturas ambientes. *Rev. Bras. Zoot.*, v.32, n.8, p.1956-1961, 2003.
- SMITH, J. F.; TERVIT, H. R.; MCGOWAN, L. T. et al. Effect of aspiration system on the recovery and development of sheep follicular oocytes. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, v.26, p.16, 1994.
- SOUZA, B.B. et al. Temperatura superficial e índice de tolerância ao calor de caprinos de diferentes grupos raciais no semi-árido paraibano. *Ciênc. Agrotec.*, v.32, n.1, p.275-280, 2008.
- STARLING, J. M. C.; SILVA, R. G.; MUNÔZ, M. C. et al. Análise de algumas variáveis fisiológicas para avaliação do grau de adaptação de ovinos submetidos ao estresse por calor. *Rev. Bras. Zoot.*, v.31, n.5, p.2070-2077, 2002.
- STARLING, J. M. C.; SILVA, R. G.; NEGRÃO, J. A. et al. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *Rev. Bras. Zoot.*, v.34, n.6, p.2064-2073, 2005.

STUBBINGS, R. B.; WOSIK, C.; ARMSTRONG, D. T. Ovarian response in calves to multiple versus a single subcutaneous injection of Folltropin. *Theriogenology*, v.39, n.1, p.321, 1993.

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN, L. T. et al. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, v.24, p.26, 1992.

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN, L. T. et al. Laparoscopic recovery of ovarian oocytes from slaughtered or living sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, v.60, p.25, 1993.

WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W. et al. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.9–19, 1997.

## CAPÍTULO 3

### **Efeito do estresse calórico materno na qualidade e capacidade de maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas Santa Inês**

#### RESUMO

Com a finalidade de avaliar a qualidade dos complexos cumulus-oócito e a capacidade de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito (CCOs) de ovelhas Santa Inês mantidas em condições climáticas de conforto e estresse calórico em câmara climatizada. Os CCOs recuperados em três seções de aspiração de sete ovelhas em condições de conforto e sete em condições de estresse calórico foram avaliados pelo teste de TUNEL ou maturados *in vitro*. Não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos (conforto e calor) para os percentuais de CCOs viáveis a maturação (grau I e II), em apoptose (TUNEL-positivo), percentual de oócitos que atingiram migração total dos granulos corticais e que chegaram ao estágio de metáfase II. Concluindo, o estresse calórico de 35°C e 68% de UR durante a fase de recrutamento folicular, não prejudica a qualidade dos complexos cumulus-oócito a maturação *in vitro* e a incidência de apoptose em oócitos de ovelhas Santa Inês.

**Palavras Chave:** apoptose, estresse calórico, oócitos, ovinos

#### ABSTRACT

*In order to evaluate the quality of cumulus-oocyte complexes and the ability of in vitro maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs) of Santa Inês ewes kept in a climate of comfort and heat stress in a climatic chamber. The COCs recovered in three sections suction seven sheep in conditions of comfort and seven conditions of heat stress were assessed by TUNEL assay or in vitro maturation. There were no differences ( $P > 0.05$ ) between treatments (comfort and heat stress) for the percentage of viable COCs maturation (grade I and II), apoptosis (TUNEL-positive), percentage of oocytes that reached full migration of cortical granules and reached the metaphase II stage. In conclusion, heat stress of 35 °C and 68% RH during the follicular recruitment, does not affect the quality of the cumulus-oocyte maturation in vitro and the incidence of apoptosis in oocytes of Santa Inês ewes.*

**Keywords:** apoptosis, heat stress, oocyte, sheep

#### INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embrião surgiu como uma biotecnologia promissora na multiplicação de animais de alto valor genético, uma vez, que permitiu a otimização das fêmeas doadoras de oócitos e o aumento da quantidade de embriões produzidos, tornando-se uma alternativa às

técnicas invasivas de recuperação de embriões *in vivo* (Traldi, 2008).

Esta técnica envolve a coleta dos complexos cumulus-oócito, maturação e fecundação dos oócitos *in vitro* até o cultivo embrionário em condições laboratoriais. Contudo, o sucesso dessa biotecnologia depende, principalmente, da qualidade dos oócitos utilizados e sua capacidade de

maturação. Essas estão diretamente relacionadas à presença e integridade das células do *cumulus* e a capacidade de retomar e completar a divisão meiótica (Sirard et al., 2006).

O processo de maturação do oócito *in vitro* é considerado uma etapa crucial, uma vez que o potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário está diretamente relacionado à adequada maturação citoplasmática e nuclear. A exposição dos oócitos durante a maturação a temperaturas elevadas (choque térmico), no estágio de vesícula germinal (Payton et al., 2004) ou durante os primeiros estágios de maturação (Roth e Hansen, 2005) interfere nos processos de maturação destes, ocasionando redução da capacidade de fertilização e subsequente desenvolvimento. Além disso, o estresse térmico calórico pode aumentar a proporção de oócitos que expressam alta atividade de caspase e fragmentação nuclear, determinada pela técnica TUNEL (Roth e Hansen 2004a, b). Soto e Smith (2009) relataram que o choque térmico durante a maturação (41°C, 22 h) aumenta a proporção de oócitos com cromatina TUNEL-positiva.

Neste contexto, este experimento teve como finalidade avaliar a qualidade dos complexos cumulus-oócito e a capacidade de maturação *in vitro* após serem punccionados de ovelhas Santa Inês, mantidas nas condições de conforto e estresse calórico em câmara climatizada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local, obtenção e classificação dos complexos cumulus-oócito

Este experimento foi realizado no Laboratório de produção *in vitro* de embriões do Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Para realização deste experimento foram utilizados os complexos cumulus-oócito

(CCOs) recuperados no experimento anterior (Capítulo 2). Estes CCOs foram avaliados com auxílio de estereomicroscópio (Nikon®) quanto às características das células do *cumulus* e ooplasma, e classificados de acordo com Morton et al. (2005) em:

**Grau I:** Oócito com mais de três camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granulado;

**Grau II:** Oócito com duas a três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo e uniformemente granulado;

**Grau III:** Oócito com uma camada incompleta de células do *cumulus* ou poucas células do *cumulus*, e citoplasma homogêneo;

**Desnudo:** Oócitos desprovidos de células do *cumulus*, e citoplasma homogêneo, e

**Degenerado:** Oócito com *cumulus* expandido, com alterações morfológicas no ooplasma (vacúolos) e na zona pelúcida ou com ooplasma heterogêneo.

### Detecção do índice apoptótico (TUNEL)

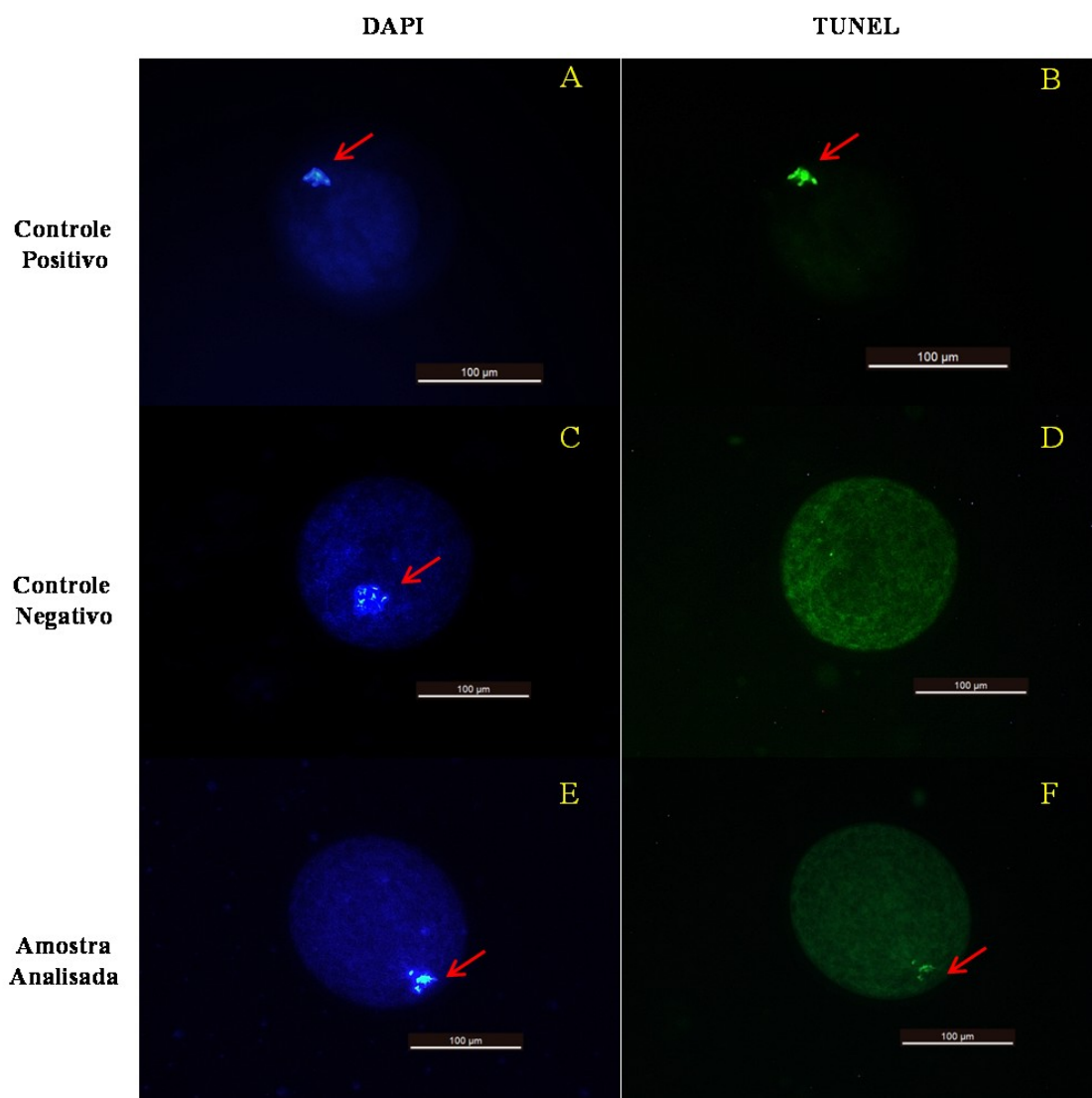
Para detecção do número de oócitos em apoptose foi utilizando kit específico DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System® (Promega, Madison – EUA), adaptado da metodologia descrita por Paula-Lopes e Hansen (2002).

Para a realização deste procedimento, os oócitos foram fixados em paraformaldeído a 4% e mantidos a 4°C por 25 minutos. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS com BSA (0,1%) e permeabilizados em solução de Triton a 2%. Uma nova lavagem dos oócitos foi realizada com solução de PBS com BSA e esses foram colocados em tampão de equilíbrio. Os oócitos foram então incubados em solução de enzima rTdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinant) adicionada de Mix de Nucleotídeos a 37°C. Alguns oócitos foram separados para

controle positivo e negativo da técnica. Todos os oócitos (testes, controle positivo e negativo) foram lavados em SSC2X, em solução de PBS com BSA e colocados sobre lâmina histológica. As lâminas foram coradas com DAPI e cuidadosamente recobertas com laminulas plásticas.

Os oócitos foram examinados em microscopia de fluorescência (200X) (Motic BA400, Motic Instruments Inc.,

Richmond, Canada) utilizando-se filtro DAPI (350-460 nm) e filtro FITC (480-535 nm). Desta forma, duas imagens (uma no DAPI e outra no FITC) foram obtidas de cada oócito. No filtro DAPI foi observada a cromatina dos oócitos e no FITC a cromatina corada em verde, considerada apoptótica. O índice apoptótico foi obtido pela proporção de oócitos com a cromatina apoptótica em relação ao número total de oócitos.



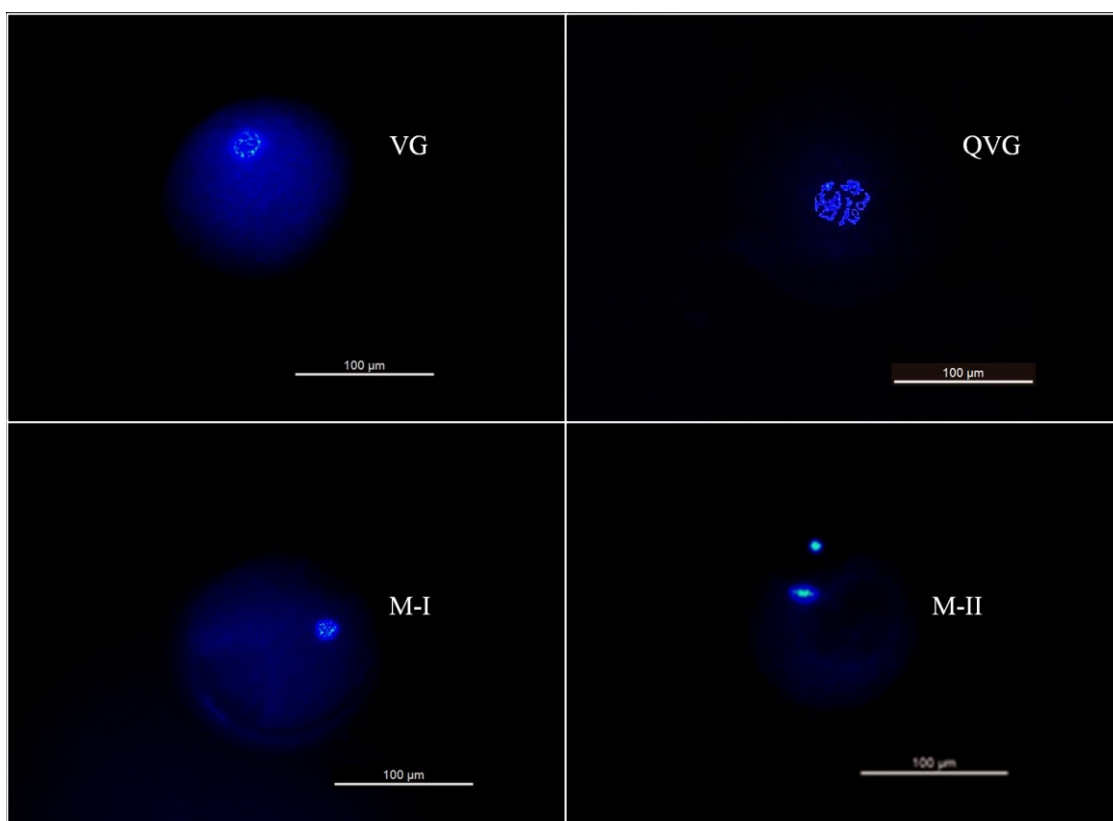
**Figura 1.** Oócitos com a cromatina marcada por DAPI (A, C, E); oócitos com fragmentação de DNA marcado com a enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinant conjugada ao FITC (B, F); oócito sem marcação da enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinant conjugada ao FITC.

### Maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos

Após classificação, os complexos cumulus-oócito de graus I ou II de cada grupo experimental (conforto e calor) foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* (MIV) em meio apropriado (Maturação Ovina In Vitro Brasil<sup>®</sup>, Mogi Mirim, Brasil) em incubadora a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar e umidade saturada, por um período de 22 a 24 horas.

### Avaliação da maturação oocitária

Após o período de incubação, todos os CCOs foram avaliados, sob estereomicroscópio quanto ao grau de expansão das células do *cumulus*, classificados e quantificados em 3 categorias: expansão total das células do *cumulus*; expansão parcial do *cumulus* e ausência de expansão do *cumulus*. Esta avaliação visou examinar o efeito do ambiente climático sobre as células do *cumulus* e a relação entre a expansão do *cumulus* e maturação nuclear.



**Figura 2.** Estádios de maturação nuclear dos oócitos: (VG) Vesícula Germinativa; (QVG) Quebra da Vesícula Germinativa; (M-I) Metáfase I; (M-II) Metáfase II.

Para determinação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática os complexos cumulus-oócito foram desnudados (solução de hialuronidase 2 % em PBS Ca<sup>++</sup> free a 38,5°C por 5 minutos), fixados (Paraformoldeído a 4% em PBS por 30

minutos à temperatura ambiente) e armazenados a 4°C em solução de bloqueio – SB (PBS com 1mg/mL de BSA, 100mM de glicina e 0,2% de azida de sódio) para posterior avaliação.

Posteriormente, os oócitos foram permeabilizados em solução de bloqueio com a adição de 0,1% de Triton X-100 por 5 minutos a 38°C. Estes oócitos então foram incubados (38°C) com 100 µg/mL de *peanut agglutinin* conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA, Sigma®) em SB por 30 minutos. Em seguida foram lavados em SB três vezes (5 minutos cada vez), montados em lâmina com 10 µg/mL de Hoechst 33342 diluído em 10% de PBS e 90% de glicerol.

A visualização foi feita em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação BP 330-385nm com barreira de 420nm para avaliação do estágio nuclear, e BP 335nm com barreira de 515nm para avaliação da distribuição de grânulos corticais no interior dos oócitos, de acordo com as adaptações da metodologia descrita por Cherr et al. (1988).

A classificação da maturação citoplasmática foi avaliada baseada na distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito, como segue:

**Imaturo:** Grânulos corticais distribuídos uniformemente por todo o citoplasma;

**Maturação parcial:** Grânulos corticais dispersos no citoplasma e também na região periférica do oócito, próximos à membrana plasmática;

**Maturação completa:** Grânulos corticais dispersos somente na periferia do oócito, próximos à membrana plasmática.

Já a classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada com base na morfologia do DNA (Figura 2):

**Vesícula Germinativa (VG):** presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados;

**Quebra da Vesícula Germinativa (QVG):** cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular;

**Metáfase-I (M-I):** cromossomos atingem grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos;

**Metáfase-II (M-II):** apresentam um grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo, mais afastado, caracterizado pela placa metafásica;

**D/NI:** degenerados ou não passíveis de identificação.

### Análises Estatísticas

Todas as variáveis avaliadas foram analisadas através de tabelas de contingência, aplicando-se o teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Classificação dos complexos cumulus-oócito

Neste experimento, os tratamentos climáticos exerceram efeitos sobre a proporção de CCOs grau I (um) e II (dois), com maior proporção de CCOs grau I no grupo de ovelhas que estavam em conforto, e maior proporção de CCOs grau II no grupo que estava sobre calor ( $P < 0,05$ ). Já as proporções de CCOs grau III (três), desnudos e degenerados, não tiveram diferença entre os tratamentos climáticos ( $P < 0,05$ ), como podemos ver na tabela 1.

**Tabela 1.** Qualidade dos CCOs aspirados das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições de conforto e calor em câmara climatizada

Classificação dos CCOs	Tratamentos	
	Conforto (n)	Calor (n)
Grau – I	34,1% (70) <sup>a</sup>	19,0% (33) <sup>b</sup>
Grau – II	32,7% (67) <sup>b</sup>	47,7% (83) <sup>a</sup>
Grau – III	20,0% (41)	19,0% (33)
Desnudos	5,4% (11)	2,9% (5)
Degenerado	7,8% (16)	11,4% (20)
Total	100% (205)	100% (174)

Percentagens seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

Quando os CCOs foram classificados apenas como viáveis (grau I e II) e não viáveis (grau III, desnudos e degenerados), não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as proporções de CCOs obtidos das ovelhas que estavam nos tratamentos conforto e calor (Tabela 2).

**Tabela 2.** Classificação quanto à viabilidade para maturação dos CCOs (grau I e II) aspirados das ovelhas Santa Inês mantidas nas condições ambientais de conforto e calor em câmara climatizada

Classificação dos CCOs	Tratamentos	
	Conforto (n)	Calor (n)
Viáveis	66,8% (137/205)	66,7% (116/174)
Não viáveis	33,2% (68/205)	33,3% (58/174)

Não houve diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

A adequada seleção dos CCOs permite aumentar as taxas de maturação *in vitro*, diminuindo as variações nos resultados. Quando se utiliza oócitos cobertos com três ou mais camadas de células do *cumulus* completas e aderidas ou com *cumulus* intacto, com ooplasma homogêneo e sem grânulos rugosos é possível conseguir melhores resultados do que com *cumulus* incompleto ou expandido (Yang et al.,

1990). Contudo, em ovinos, o emprego dos CCOs na maturação *in vitro*, não obedece a um critério rígido, variando desde aqueles com *cumulus* compacto até os que apresentam poucas camadas completas de células do *cumulus* (Izquierdo et al., 1999).

Essas células são responsáveis por diversas funções, dentre elas, a regulação da maturação oocitária, estando envolvidas tanto no bloqueio, quanto no reinício da divisão meiótica e na progressão da maturação citoplasmática (Tanghe et al., 2002). Além disso, essas células também garantem a nutrição do oócito através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos, e aminoácidos pelas junções “gap” comunicantes (Gandolfi et al., 2005).

#### Apoptose por fragmentação de DNA (TUNEL)

A porcentagem de oócitos em vesícula germinativa (sem maturação) com apoptose por fragmentação do DNA (TUNEL-positivo) não foi afetada pelos tratamentos ambientais ( $P > 0,05$ ), quando a proporção de oócitos TUNEL-positivo foi 15,5% nas condições de conforto e 25,8% no estresse calórico.

**Tabela 3.** Percentual de oócitos em apoptose (TUNEL-positivo) dos CCOs aspirados por videolaparoscopia de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada

Oócitos	Tratamentos	
	Conforto(n)	Calor (n)
Tunel Negativo	84,5% (49/58)	74,2% (43/58)
Tunel Positivo	15,5% (9/58)	25,8% (15/58)

Não houve diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ); Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

Chaves et al. (2011), também não encontraram diferenças na proporção de oócitos de cabra em apoptose, durante o estágio de vesícula germinativa (não

maturados), entre os períodos seco e chuvoso do estado de Pernambuco. A porcentagem de oócitos apoptóticos (TUNEL-positivo) encontrada por eles foi de 10,86% no período seco e 9,08% no chuvoso.

Segundo Roth e Hansen (2004a), apenas uma pequena fração dos oócitos expostos a altas temperaturas do ambiente desenvolvem mudanças apoptóticas, pois existem diversos componentes inter e intracelulares que definem se um oócito pode reagir a estas agressões naturais do ambiente. Além disso, as células do *cumulus* parecem ter um papel fundamental na proteção dos oócitos contra apoptose induzida por estresse oxidativo (Tatemoto et al., 2000). Entretanto, quando Hoth e Hansen (2004b) pesquisaram a competência de desenvolvimento e resistência de oócitos bovinos a condições de estresse térmico, evidenciaram que as altas temperaturas do ambiente, mesmo que dentro de intervalos fisiológicos, podem ser um estímulo à morte celular programada em oócitos de mamíferos.

Para Van Blerkom e Davis (1998), a fragmentação do DNA celular nos oócitos nem sempre é resultado da ativação da cascata de caspase. Sendo assim, é possível que as variações térmicas do corpo materno, provocada pelas temperaturas ambientais dos tratamentos não tenham sido suficientes para induzir níveis de fragmentação na cromatina para produzir um complemento total de mudanças associadas a apoptose que possam ser observadas nas células nessas condições, independente da temperatura ambiental imposta.

### **Maturação oocitária**

Considerando os dados contidos na tabela 4, pode-se verificar que o percentual de complexos cumulus-oócito (CCOs) com expansão das células do cumulus após a

maturação *in vitro*, não foi diferente entre os CCOs obtidos das ovelhas que estavam em condições ambientais de conforto e calor ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Expansão das células do cumulus dos CCOs de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo *in vitro*

Expansão	Tratamentos	
	Conforto (n)	Calor (n)
Total	51,9% (41/79)	51,7% (30/58)
Parcial	30,4% (24/79)	31,0% (18/58)
Ausente	17,7% (14/79)	17,3% (10/58)

Não houve diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ); Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%.

As células do *cumulus* correspondem a um grupo de células da granulosa que circundam o oócito e com o qual estabelecem íntima comunicação através dos complexos juncionais, também conhecidos como junções gap comunicantes (GJCs). Esta íntima associação entre as células do *cumulus* e o oócito se forma e se mantém durante o crescimento folicular e desenvolvimento do oócito. Nos oócitos imaturos, ou seja, que ainda não completaram os processos de maturação nuclear e citoplasmática, a manutenção da integridade das células do *cumulus* e das junções gap comunicantes é indispensável para o progresso do desenvolvimento oocitário e aquisição de competência para finalizar a maturação e sustentar os posteriores processos de fertilização e desenvolvimento embrionário (Hyttel et al., 1989; Shimada e Terada, 2002).

A quebra das junções “gap” comunicantes entre as células do *cumulus* e o oócito está diretamente relacionada ao reinício meiótico oocitário e é decorrente da expansão do *cumulus* (Motlík et al., 1986), caracterizada pela síntese e secreção de ácido hialurônico por estas células, o qual

se deposita entre os espaços intercelulares (Ball et al., 1982). Por essa razão, a expansão do *cumulus* pode ser considerada um indicativo de que os oócitos já reiniciaram o processo de maturação nuclear.

Quando se realiza a maturação dos oócitos *in vitro*, a expansão das células cumulus começa a ser visível a partir de 12 horas de maturação (Sutovsky et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do *cumulus*, impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de maturação e clivagem (Luvoni et al., 1996), e do choque térmico que bloqueia a síntese das proteínas do choque térmico (HSP-70) que protege os oócitos durante a maturação *in vivo* e *in vitro* (Edwards e Hansen, 1996).

A expressão de HSP-70 ocorre constitutivamente em vários tipos celulares, inclusive nas células do *cumulus*, e tem sua expressão aumentada quando as células são expostas a agentes estressores como o calor e o estresse oxidativo (Luft e Dix, 1999). Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas intracelulares, além de inibir a apoptose celular.

Assim como os CCOs obtidos das ovelhas dos grupos conforto e calor, não apresentaram diferenças na expansão das células do cumulus, os mesmos também não apresentaram diferenças no percentual de maturação citoplasmática (Tabela 5), verificada por migração completa dos grânulos corticais, entre as temperaturas de conforto e calor.

Wang et al. (2009), verificando os efeitos do choque térmico na maturação *in vitro* de oócitos de camundongos, registraram que a maturação citoplasmática (migração dos grânulos corticais e das mitocôndrias) foi prejudicada quando maturados a 40 °C, enquanto que a maturação nuclear

(desenvolvimento até o estágio de metáfase II) não foi afetada até a temperatura de 40,7 °C. Segundo os mesmos autores, tais resultados demonstram que a maturação citoplasmática do oócito é menos tolerante ao estresse térmico que a maturação nuclear. Entretanto, no presente experimento, o estresse provocado pelo tratamento calor (35,4 °C e UR de 67,4%) não elevou a temperatura corporal a 40°C. A temperatura retal máxima aproximou-se de 39,3 °C (38,7 ± 0,6 °C, Tabela 2, Capítulo 2), o que possivelmente não causou estresse suficiente para promover diferenças entre os tratamentos.

**Tabela 5.** Maturação citoplasmática (migração dos grânulos corticais) dos oócitos de ovelhas Santa Inês mantidas em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo *in vitro*

Maturação Citoplasmática	Tratamentos	
	Conforto(n)	Calor (n)
Completa	47,2% (25/53)	48,0% (24/50)
Parcial	30,2% (16/53)	32,0% (16/50)
Imaturo	22,6% (12/53)	20,0% (10/50)

Não houve diferença entre os tratamentos (P > 0,05); Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%; CG = Grânulos corticais.

A maturação meiótica em oócitos de mamíferos é um processo complexo que envolve a reorganização coordenada tanto do citoesqueleto, quanto da cromatina. Conforme demonstrado em alguns estudos (Roth e Hansen, 2005 e Santos-Junior, 2011), o choque térmico durante a maturação dos oócitos, podem prejudicar a retomada da meiose. Santos-Junior (2011), verificando o efeito do tempo de exposição (0, 3, 6, 12, 18 e 24 horas) ao choque térmico (41°C), na maturação *in vitro* de oócitos ovinos, obteve 70,7% de oócitos maturados (M-II) no grupo controle (zero hora), contudo, observou redução gradativa

no percentual de maturação dos oócitos à medida que o tempo de exposição ao choque térmico aumentava.

Neste experimento, não foi evidenciada influência do estresse calórico materno das ovelhas nos percentuais de oócitos maturados *in vitro* que atingiram o estágio de M-II ( $P > 0,05$ ), ou outros estádios de maturação do oócito (Tabela 6).

Chaves et al. (2011), investigando a influência dos períodos seco e chuvoso do agreste pernambucano na capacidade de maturação *in vitro* de oócitos de cabras, também não encontraram diferença entre os oócitos que atingiram o estágio de metáfase-II após a MIV.

**Tabela 6.** Estádios de maturação nuclear dos CCOs de ovelhas Santa Inês em duas condições ambientais (conforto e calor) em câmara climatizada, após 22-24 horas de cultivo *in vitro*

Estádios	Tratamentos	
	Conforto (n)	Calor (n)
M-II	77,9% (53/68)	72,0% (36/50)
M-I	11,8% (8/68)	10,0% (5/50)
QVG	7,4% (5/68)	10,0% (5/50)
D/NI	2,9% (2/68)	8,0% (4/50)

Não houve diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Conforto = 24,4 °C e UR de 68%; Calor = 35,4 °C e UR de 67,4%; M-II = Metáfase-II; M-I = Metáfase-I; QVG = Quebra da vesícula germinativa; D/NI = Degenerados/Não identificável.

Trabalhos em outras espécies (bovinos, caprinos e ratos) têm mostrado que o choque térmico pode comprometer alguns eventos de maturação nuclear e também citoplasmática, como a redistribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito (Payton et al., 2004 e Wang et al., 2009), reorganização do citoesqueleto e a formação do fuso (Roth e Hansen, 2005 e Wang et al., 2009). Potencialmente, estas alterações podem levar a maturação nuclear incompleta (Roth e Hansen, 2005), e consequentemente, falhas na fertilização e

formação de embriões anormais (Roth, 2012). No trabalho de Roth e Hansen (2005), a maior parte dos oócitos que sofreram choque térmico (40 e 41°C) durante a maturação *in vitro* não chegaram ao estágio de M-II, sendo o desenvolvimento interrompido nos estádios anteriores.

Os dados encontrados permitem inferir que o desconforto calórico do ITU 87 promovido pela alta temperatura e umidade (35,4°C e 67% de UR), não foi suficiente para afetar a capacidade de maturação dos CCOs, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos (conforto e calor) no percentual de CCOs com expansão de células do cumulus, no percentual de oócitos com migração completa dos grânulos corticais e no percentual de oócitos que atingiram o estágio de divisão meiótica de Metáfase-II. Possivelmente, as alterações encontradas nos parâmetros fisiológicos (capítulo anterior), podem indicar que as respostas frente ao estresse calórico compensaram a homeostasia das ovelhas e essas não tiveram reflexos nas respostas reprodutivas.

## CONCLUSÕES

As condições climáticas impostas pelo tratamento calor sobre os animais, na fase de recrutamento folicular, não prejudicam a qualidade dos complexos cumulus-oócito, a maturação *in vitro* e a incidência de morte celular programada (apoptose) dos oócitos das ovelhas Santa Inês.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, G. D.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. et al. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.28, p.113–122, 1982.
- CHAVES, R. M.; BEZERRA, F. Q. G.; LIMA, P. F. et al. Maturação nuclear in

- vitro e morte celular por apoptose em oócitos de caprinos nos períodos seco e chuvoso. *Cienc. Anim. Bras.*, v.12, n.4, p.593 - 601, 2011.
- CHERR, G.; DROBINS, E.; KATZ, D. Localization of cortical constituents before and after exocytosis in hamster egg. *J. Exp. Zool.*, v.26, p.81-93, 1988.
- EDWARDS, J. L. e HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine twocell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.*, v.55, p.340-346, 1996.
- GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F. et al. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.24, n.1, p.413-423, 2005,
- HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, v.38, p.35-47, 1989.
- IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, v.52, p.847-861, 1999.
- LUFT, J.C. e DIX, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperon.*, v.4, p. 162-170, 1999.
- LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing media. *Mol. Reprod. Develop.*, v.43, p.437-443, 1996.
- MORTON, K. M.; DE GRAAF, S. P.; CAMPBELL, A. et al. Repeated oocyte pick up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.*, v.40, p.422-428, 2005.
- MORTON K.M.; MAXWELL W.M.C.; EVANS G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.43, p.106-110, 2008.
- MOTLIK, J.; FULKA, J.; FLECHON, J. E. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v.76, p.31-37, 1986.
- PAULA-LOPES, F. F. e HANSEN P. J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, v.295, p.37-42, 2002.
- PAYTON R. R.; ROMAR R.; COY P.; SAXTON A. M. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol. Reprod.* 71: 1303-1308, 2004.
- RIZOS D.; LONERGAN P.; WARD F.; et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.234-248, 2002.
- RODRÍGUEZ C.; ANEL L.; ALVAREZ M. et al. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod. Domest. Anim.*, v.41, p.106-113, 2006.
- ROTH, Z. Tratamentos hormonais para aumentar a fertilidade em vacas de leite de alta produção durante o verão e o outono, estudos básicos e aplicados. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E

REPRODUÇÃO DE BOVINOS, XV, 2012, Uberaba. *Anais...* Uberaba, MG, 2012, p.1-13.

ROTH, Z. e 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. e HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v.71, p.1898-1906, 2004a.

ROTH, Z. & HANSEN, P. J. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v.71, p.2072-2078, 2004b.

SANTOS JUNIOR, E. R. *Efeito do estresse térmico na maturação in vitro de oócitos caprinos e ovinos em protocolos de produção de embriões*. 2010, 114p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife, PE.

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

SHIMADA, M. e TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, vol.8, n.7, p.612–618, 2002.

SOTO, P. e SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 637-646, 2009.

SUTOVSKY, P.; FLECHON, J. E.; FLECHON, B. et al. Dynamic changes of

gap junctions and cytoskeleton during in vitro of culture cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.*, v.49, p.1277-1287, 1993.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; NAUWYNCK, H. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.414-424, 2002.

TATEMOTO, H.; SAKURI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptosis cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, v.63, p.805-810, 2000.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W. DNA strand break and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and culture mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Hum. Reprod.*, v.13, p.1317-1324, 1998.

WANG, J. Z.; SUI, H. S.; MIAO, D. Q. et al. Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, v.137, p.181–189, 2009.

YANG, X. e LU, K. H. *The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro*. *Theriogenology*, v.43, p.355-362, 1990.

## CAPÍTULO 4

### **Influência do sombreamento artificial sobre o conforto térmico e produção de embriões por superovulação de ovelhas mantidas a pasto em duas distintas épocas do ano**

#### **RESUMO**

Com objetivo de avaliar a influencia do fornecimento de sombra artificial sobre as respostas fisiológicas e reprodutivas de ovelhas Santa Inês. Vinte e dois animais desta raça foram utilizados, 11 alojadas em piquetes com oferta de sombra artificial, e 11 em piquetes sem qualquer fonte de sombra. Estas foram submetidas a protocolo de superovulação e coleta de embriões, em duas diferentes épocas do ano (meses de maiores e menores temperaturas). A análise dos resultados encontrados demonstrou não haver diferença entre a presença ou ausência de sombra, ou entre as épocas do ano ( $P > 0,05$ ) para: número de ovelhas em estro, média de embriões e de embriões viáveis, percentagem de embriões viáveis e média de folículos anovulatórios. Contudo, foi encontrado maior média no número de ovulações para as ovelhas superovuladas nos meses de menores temperaturas ( $P < 0,05$ ). Concluindo, a presença de sombra artificial não altera a resposta a superovulação, e as condições climáticas mais desconfortantes dos meses mais quentes reduzem as taxas de ovulações de ovelhas Santa Inês.

**Palavras Chave:** embrião, estresse calórico, ovinos, superovulação.

#### **ABSTRACT**

*In order to evaluate the influence of providing artificial shade on the physiological and reproductive Santa Inês ewes. Twenty-two animals of this breed were used, housed in 11 paddocks offer artificial shade, and 11 paddocks without any source of shade. These were subjected to superovulation protocol and collection of embryos in two different seasons (months of highest and lowest temperatures). The analysis of the results showed no difference between the presence or absence of shade, or between seasons ( $P > 0.05$ ): the number of ewes in estrus, mean number of embryos and viable embryos, percentage of embryos and average anovulatory follicles. However, it has been found in the higher average number of ovulations in superovulated sheep for months lower temperatures ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the presence of artificial shade does not alter the response to superovulation, and climatic conditions more discomforting the warmer months reduced ovulation rates of Santa Inês ewes.*

**Keywords:** embryo, heat stress, sheep, super-ovulation.

## INTRODUÇÃO

A criação de ovinos nos últimos anos tem se mostrado uma atividade de grande importância para algumas regiões do Brasil, com destaque para o nordeste, com 10,1 milhões de cabeças em 2011, que é a região com maior participação do rebanho nacional (57,24%, IBGE). Este crescimento da ovinocultura está associado à maior disseminação de animais de raças deslanadas, principalmente nas regiões Centro-oeste e Sudeste.

Nos sistemas de criação de ovinos, os animais encontram-se expostos a ação do meio que os rodeia. Nesse sentido, as condições climáticas existentes na região e o tipo de exploração requerem a escolha de raças mais adaptadas às condições ambientais locais, como a Santa Inês, que tem se destacado devido à boa adaptabilidade, prolificidade e rusticidade, aliadas à baixa susceptibilidade a endo e ectoparasitas (Cruz Júnior, 2006).

Sabe-se, que em situações de temperatura elevada, os animais manifestam certo desconforto fisiológico, vindo a modificar seus parâmetros clínicos naturais, na tentativa de manter a homeotermia. Nos ovinos, tem sido relatadas mudanças na temperatura retal, frequência respiratória e volume de ar inalado quando estes encontram-se sob efeito do estresse calórico (Quesada et al., 2001; Starling et al., 2002; Cezar et al., 2004). Esta espécie utiliza com muita eficiência o aumento da frequência respiratória, como forma de perda de calor. Segundo Starling et al. (2002), o mecanismo de perda de calor mais eficaz é o evaporativo, por não depender do diferencial de temperatura entre o organismo e a atmosfera. Essa eficiência em perder calor por via evaporativa tem permitido aos ovinos, adaptar-se muito bem a regiões de temperaturas elevadas.

Os caminhos pelos quais o estresse calórico interfere na reprodução, ainda não são bem conhecidos. Entretanto, sabe-se que o estresse calórico pode suprimir a secreção das gonadotrofinas e prejudicar a ciclicidade ovariana (Rivier e Rivest, 1991), e que o estresse térmico, pode influenciar na resposta superovulatória de ovelhas (Gordon, 1997; Gomes, 2011) e de vacas (Hansen et al., 2001) em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões. Naqvi et al. (2004), mostraram que o estresse térmico durante a fase de desenvolvimento folicular, em ovelhas Bharat Merino superovuladas, levou à ovulação de oócitos com reduzida competência para desenvolver, afetando a qualidade do embrião.

Diante das condições ambientais em que são criados os ovinos no Brasil e da escassez de informações a respeito de sua interferência sobre a reprodução de animais de raças nacionais, este estudo teve por objetivo avaliar a influência do fornecimento de sombra artificial sobre as respostas fisiológicas e reprodutivas de ovelhas Santa Inês, submetidas a protocolos de superovulação nos períodos de maiores e menores amplitudes térmicas do ano, na região do semiárido brasileiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Local, população experimental, manejo e alimentação**

O experimento foi conduzido nos meses de junho-agosto e outubro-novembro, no campo experimental de Bebedouro, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foram utilizadas 22 ovelhas da raça Santa Inês dispostas em dois tratamentos com 11 ovelhas cada.

Os animais foram alojados em 24 piquetes de *Tifton 85* irrigados, sendo 12 para cada tratamento, todos dotados de bebedouros e saeiros móveis. A alimentação dos animais foi pastagem de *Tifton 85* e sal

mineralizado ofertados nos piquetes. Cada piquete teve tempo de ocupação de dois dias, e 22 dias de descanso.

Os tratamentos consistiram no fornecimento ou não de sombra artificial aos animais, de modo que os animais do grupo com sombra tivessem a sua disposição 2,5m<sup>2</sup>/animal de sombreamento artificial móvel (tela preta de polipropileno com 80% de retenção luminosa), dentro do piquete. Já o grupo sem sombra, não tinha qualquer fonte de sombreamento artificial ou natural.

O experimento foi conduzido em sistema de pastejo intermitente, de maneira que os dois grupos de animais passaram por todos os piquetes, permanecendo por igual período em cada um deles, recebendo assim, iguais condições de ambiente e manejo, salvo a oferta de sombra, que foi fornecida a apenas um grupo, motivo este que diferenciou os tratamentos.

#### **Obtenção das variáveis climáticas**

Os dados climatológicos da região foram obtidos através dos registros da estação climatológica de Petrolina, PE (latitude: 09°09', longitude: 40°22' e altitude: 365,5 m), pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Semi-Árido).

Em cada área experimental (com ou sem sombra) foi instalado um termômetro de globo negro e um psicrômetro protegido por cerca na altura equivalente a da linha dorso lombar dos animais. A temperatura de bulbo seco (TBS), temperatura de bulbo úmido (TBU) e a temperatura de globo negro (TGN) de ambas as condições ambientais foram coletadas as sete e às quinze horas todos os dias durante todo o período experimental.

A umidade relativa do ar (UR) em porcentagem e a temperatura de ponto de orvalho foram obtidas através da inserção

dos dados de TBS e TBU de cada condição ambiental no programa Vaisala Humidity Calculator 2.2.

O índice de temperatura de globo e umidade (ITGU) foi adotado como o índice de conforto térmico para a estimativa da situação de estresse ou não dos animais. Este foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$ITGU = TGN + 0,36Po + 41,5$$

Onde:

TGN = temperatura do termômetro de globo negro (°C);

Po = temperatura do ponto de orvalho.

#### **Mensuração das variáveis fisiológicas**

Os parâmetros fisiológicos temperatura retal (TR) e frequência respiratória (FR) foram avaliadas nos turnos da manhã e da tarde (07h e 15h), duas vezes por semana, durante quatro semanas. Para a determinação da TR foi utilizado um termômetro digital clínico com precisão de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , introduzido no reto dos animais por um minuto. A FR foi obtida de forma exclusivamente visual, observando-se por 30 segundos os movimentos respiratórios, com a visualização concentrada na região do flanco, realizada por três observadores. Destas contagens foi retirada uma média e posteriormente multiplicada por dois, totalizando o número de movimentos respiratórios por minuto (mov/min).

#### **Avaliação das respostas reprodutivas**

Após um período de 20 dias sob as condições experimentais (com ou sem sombra artificial), as ovelhas de cada tratamento foram submetidas ao protocolo de sincronização, superovulação e coleta dos embriões.

Para a sincronização dos animais utilizou-se esponjas vaginais contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona

(Progespon<sup>®</sup>) por 12 dias. A superovulação foi induzida com 200 mg (dose total) de hormônio folículo-estimulante (FSH) (NIH-FSH-P1, Folltropin<sup>®</sup>) em seis doses decrescentes, administradas com intervalo de 12 horas, iniciando 48 horas antes da retirada da esponja vaginal. No primeiro dia do protocolo de superovulação, as fêmeas receberam juntamente com a primeira dose de FSH, 36,5µg de D-cloprostenol por via intramuscular (Veteglan<sup>®</sup>). Doze horas após a retirada das esponjas vaginais, as doadoras foram expostas a carneiros de fertilidade comprovada, a cada 4 horas até a detecção do estro, ou, até completar 24 horas de observação, quando foram realizadas as primeiras coberturas por monta natural. A segunda cobertura foi realizada exatamente 24 horas após a primeira, também por monta natural.

Seis dias após o início do estro, as ovelhas foram submetidas à laparoscopia, sob efeito de anestesia geral, para inspeção dos ovários e contagem do número de corpos lúteos (CL). Apenas as ovelhas que tinham quatro ou mais CL no somatório dos dois ovários foram submetidas aos procedimentos de coleta de embriões.

As coletas dos embriões foram realizadas cirurgicamente através de uma incisão de aproximadamente oito cm na linha Alba, em posição cranial ao úbere. Após a exposição dos cornos uterinos, estes foram internamente lavados com auxílio de uma sonda de Foley n.10, um cateter Jelco n.18 e 40 mL de solução de PBS (Phospated Buffered Saline). As estruturas coletadas foram avaliadas com auxílio de estereomicroscópio e classificadas de acordo com a International Embryo Transfer Society (IETS) (Robertson e Nelson, 1999).

No momento da laparotomia e exposição dos cornos uterinos, a inspeção dos ovários e a contagem do número de corpos lúteos foram novamente realizadas, a fim de

confirmar com exatidão o número de ovulações.

Todas as mensurações e avaliações acima descritas foram realizadas com a mesma metodologia e nos mesmos animais em duas épocas distintas do mesmo ano, nos meses menos quentes (jun/ago) e nos meses mais quentes (out/nov).

### **Análises estatísticas**

Este experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas, com duas parcelas (piquetes com sombra e sem sombra) e duas subparcelas (épocas do ano), contendo 11 repetições.

Os parâmetros fisiológicos e os dados climáticos foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes de Lilliefors e Bartlett respectivamente, como apresentaram distribuição normal, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se a ocorrência dos erros (a) e (b), referentes à parcela e subparcelas, respectivamente. Os resultados obtidos tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dentre as respostas reprodutivas, as variáveis avaliadas: resposta à superovulação, taxa de recuperação embrionária, percentagem de embriões viáveis e estágio de desenvolvimento embrionário (mórula e blastocisto) foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado, de acordo com a época do ano e condições ambientais.

Já as variáveis: número de ovulações, estruturas recuperadas, oócitos, embriões e embriões viáveis foram verificadas quanto a sua normalidade e homocedasticidade pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente, antes e após transformações logarítmica. Como não

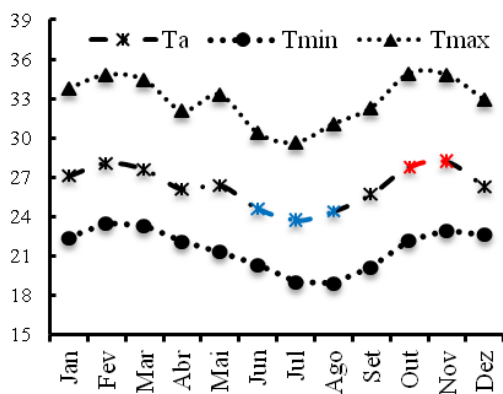
apresentaram distribuição normal, mesmo após transformação, essas variáveis foram submetidas à análise não paramétrica, utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis para as quatro condições testadas (dois ambientes em duas épocas), Wilcoxon para as épocas e Mann-Whitney para os tratamentos ambientais com e sem sombra.

Para a realização das análises estatísticas foram utilizados os programas estatísticos ASSISTAT versão 3.6 Beta (2011) e GraphPad Prism 5. Para todas as comparações foi utilizado nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Variáveis Climáticas

A distribuição das médias das temperaturas do ar ( $T_a$ ) ao longo do ano (Figura 1) correspondeu ao esperado com as médias dos anos anteriores, com temperaturas mais baixas nos meses de junho a agosto e temperaturas mais elevadas nos meses de outubro e novembro, motivos pelos quais, estas datas foram escolhidas para realização deste experimento.



**Figura 1.** Médias mensais das temperaturas média ( $T_a$ ), mínima ( $T_{min}$ ) e máxima ( $T_{max}$ ) do ar ( $^{\circ}C$ ) ao longo do ano na fazenda experimental.

Nenhuma das variáveis climáticas estudadas ( $T_a$ , TGN, UR e ITGU) apresentou interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos aplicados (com e sem sombra) e as épocas do ano estudadas em cada horário avaliado (Tabela 1).

As médias das variáveis climáticas  $T_a$ , TGN, UR e ITGU não foram diferentes entre os tratamentos ambientais no turno da manhã (07h), quando a radiação solar ainda exercia pouco efeito sobre os tratamentos. Já no turno da tarde (15h), as médias das  $T_a$ , TGN e do ITGU foram influenciadas pelo sombreamento artificial instalado nos piquetes, sendo menores ( $P < 0,05$ ) no tratamento com sombra (Tabela 1). A única variável que não sofreu influência do sombreamento nos piquetes foi a UR, a qual apresentou valores bem reduzidos neste turno, quando comparados com os valores do turno da manhã.

Como esperado, as épocas escolhidas para a realização do experimento influenciaram diretamente as variáveis climáticas estudadas. Conforme observa-se na tabela 1, as médias das  $T_a$ , TGN e dos ITGU nos meses out/nov foram superiores ( $P < 0,05$ ) às médias dos meses jun/ago nos dois turnos do dia. A única exceção entre as variáveis climáticas foi a UR, que sofreu influência das épocas estudadas apenas no turno da manhã, com média da UR do período jun/ago superior à média do período out/nov ( $P < 0,05$ ).

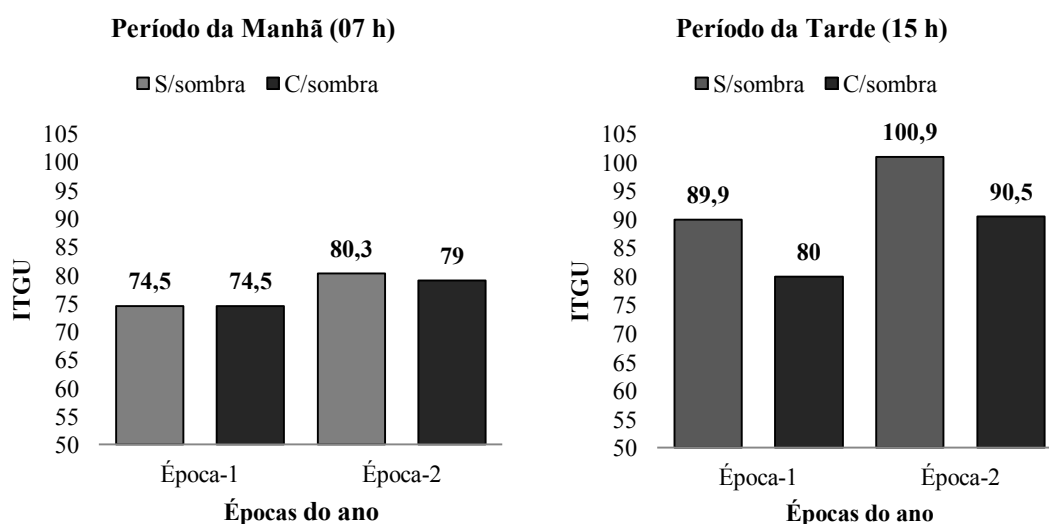
**Tabela 1.** Temperatura do ar (Ta), temperatura de globo negro (TGN), umidade relativa do ar (UR) e índice de temperatura de globo e umidade (ITGU) nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas (jun/ago e out/nov), nos turnos da manhã (07 h) e da tarde (15 h)

Variável	Tratamentos		Épocas	
	C/sombra	S/sombra	Jun/Ago	Out/Nov
<b>Manhã (07 h)</b>				
Ta (°C)	23,6 ± 1,7	23,1 ± 1,7	22,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	24,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
TGN (°C)	28,5 ± 2,8	29,1 ± 3,0	26,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	31,1 ± 1,8 <sup>a</sup>
UR (%)	75,6 ± 6,2	77,2 ± 4,1	79,1 ± 3,7 <sup>a</sup>	73,7 ± 5,3 <sup>b</sup>
ITGU	76,7 ± 2,9	77,4 ± 3,3	74,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	79,6 ± 1,7 <sup>a</sup>
<b>Tarde (15 h)</b>				
Ta (°C)	32,9 ± 3,1 <sup>b</sup>	34,2 ± 3,1 <sup>a</sup>	30,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	36,2 ± 1,6 <sup>a</sup>
TGN (°C)	36,2 ± 4,3 <sup>b</sup>	46,7 ± 5,3 <sup>a</sup>	37,2 ± 5,3 <sup>b</sup>	45,6 ± 6,3 <sup>a</sup>
UR (%)	46,9 ± 3,7 <sup>a</sup>	45,0 ± 5,3 <sup>a</sup>	45,6 ± 4,0 <sup>a</sup>	46,2 ± 5,2 <sup>a</sup>
ITGU	85,2 ± 5,7 <sup>b</sup>	95,4 ± 6,4 <sup>a</sup>	84,9 ± 5,6 <sup>b</sup>	95,7 ± 5,8 <sup>a</sup>

As médias ± desvios padrões seguidos de letras diferentes nas linhas diferem pelo teste de Tukey, (P <0,05); Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

O índice de temperatura de globo e umidade (ITGU) foi desenvolvido por Buffington et al. (1981), como uma alternativa à equação do índice de temperatura e umidade (ITU), levando em consideração, além dos efeitos da temperatura e da umidade relativa do ar, também os efeitos combinados da radiação solar direta e indireta e velocidade do vento. Segundo Ribeiro et al. (2008) e diversos

outros autores que trabalharam com ovinos na região do semiárido nordestino, citados pelo mesmo autor (Cezar et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Santos et al., 2006; Andrade et al., 2007), valores de ITGU acima de 78 são considerados como fora da zona de conforto térmico para ovinos, apesar de ainda não ter classificação definitiva, principalmente com animais nativos da região.



**Figura 2.** Média dos índices de temperatura de globo e umidade (ITGU) nas diferentes condições ambientais (com e sem sombra) e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) nos turnos da manhã (07 h) e da tarde (15 h).

## Variáveis Fisiológicas

Avaliando os efeitos do sombreamento sobre a FR foi verificado, que os tratamentos estudados não impuseram qualquer efeito significativo ( $P > 0,05$ ) no turno da manhã. Contudo, no turno da tarde foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre os ambientes estudados (com e sem sombra), com menor FR nos animais que tinham oferta de sombra a sua disposição (Tabela 2), os quais, nos

horários mais quentes do dia podiam se refugiar da ação direta dos raios solares, reduzindo os efeitos estressores do ambiente sobre eles.

As diferenças encontradas nas condições climáticas entre as épocas estudadas, também só influenciaram a FR no turno da tarde ( $P < 0,05$ ), verificando um aumento do período jun/ago para o período out/nov de 31,2 e 33,7 mov./min nos ambientes com e sem sombra respectivamente.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão da frequência respiratória (FR) nos diferentes turnos (manhã e tarde) do dia e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) em função dos tratamentos

Turno		FR (mov./min.)			Interações
		C/sombra	S/sombra	Média	
<b>Manhã (07 h)</b>	<b>Jun/Ago</b>	16,8 $\pm$ 1,4	17,7 $\pm$ 2,7	17,2 $\pm$ 2,1	(P > 0,05)
	<b>Out/Nov</b>	18,7 $\pm$ 1,2	19,0 $\pm$ 2,0	18,9 $\pm$ 1,6	
	<b>Média</b>	17,7 $\pm$ 1,6	18,4 $\pm$ 2,4		
<b>Tarde (15 h)</b>	<b>Jun/Ago</b>	43,7 $\pm$ 9,6 <sup>Bb</sup>	57,2 $\pm$ 13,3 <sup>Ab</sup>	50,5 $\pm$ 13,2 <sup>b</sup>	(P > 0,05)
	<b>Out/Nov</b>	74,9 $\pm$ 12,6 <sup>Ba</sup>	90,9 $\pm$ 7,3 <sup>Aa</sup>	82,9 $\pm$ 13,0 <sup>a</sup>	
	<b>Média</b>	59,3 $\pm$ 19,4 <sup>B</sup>	74,1 $\pm$ 20,2 <sup>A</sup>		

\*As médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas (dentro de cada turno) diferem pelo teste de Tukey, ( $P < 0,05$ ); Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

A FR tem sido considerada um bom indicador de estresse por calor. Para Silanikove (2000), utilizar a FR para quantificar a severidade do estresse pelo calor, pode ser o método mais acessível e mais fácil para avaliar o impacto do estresse calórico sobre animais de produção em condições extensivas. Para este autor, a FR de 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 120 mov./min. caracteriza estresse baixo, médio-alto e alto para os ruminantes, respectivamente; e a FR acima de 200 mov./min. é classificado como estresse severo para ovinos.

De acordo com esta classificação proposta por Silanikove (2000), nenhum dos grupos experimentais deste trabalho, apresentou FR que os classificassem em situação de estresse calórico no turno da manhã (Tabela 2). Entretanto, no turno da tarde, as médias

das FR dos animais classificou estes em condições de estresse calórico baixo, nos dois tratamentos (com ou sem sombra) na época mais fresca; e classificou em condições de estresse calórico médio-alto e estresse calórico alto os animais com e sem sombra, respectivamente, na época mais quente.

Outro indicador de estresse térmico é a temperatura corporal, esta por sua vez, é o resultado da diferença entre toda a energia térmica produzida pelo organismo, mais a energia térmica recebida do ambiente, e a energia térmica dissipada desse organismo para o meio. Assim, alguns autores como Johnson (1980), sugere a utilização da TR como um indicador dessa diferença, podendo ser usada para avaliar a

adversidade do ambiente térmico sobre os animais.

Neste trabalho, os resultados encontrados para TR no turno da manhã, também não sofreram influência das condições

ambientais e das épocas estudadas. Mas, assim como na FR, a TR também teve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre os ambientes (com e sem sombra) e entre as épocas estudadas no período da tarde (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão da temperatura retal (TR) nos diferentes turnos (manhã e tarde) do dia e nas diferentes épocas do ano (jun/ago e out/nov) em função dos tratamentos.

Turno		TR ( $^{\circ}$ C)			Interações
		C/sombra	S/sombra	Média	
<b>Manhã</b> <b>(07 h)</b>	<b>Jun/Ago</b>	37,8 $\pm$ 0,2	37,8 $\pm$ 0,3	37,8 $\pm$ 0,3	(P>0,05)
	<b>Out/Nov</b>	37,8 $\pm$ 0,2	37,9 $\pm$ 0,3	37,8 $\pm$ 0,2	
	<b>Média</b>	37,8 $\pm$ 0,2	37,8 $\pm$ 0,3		
<b>Tarde</b> <b>(15 h)</b>	<b>Jun/Ago</b>	38,8 $\pm$ 0,1 <sup>bb</sup>	39,1 $\pm$ 0,1 <sup>ba</sup>	38,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	(P>0,05)
	<b>Out/Nov</b>	39,0 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	39,2 $\pm$ 0,1 <sup>aa</sup>	39,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	
	<b>Média</b>	38,9 $\pm$ 0,1 <sup>B</sup>	39,1 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>		

\*As médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna (dentro de cada turno) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

Observando a tabela 3, verifica-se que apesar das diferenças encontradas no turno da tarde, os valores médios encontram-se próximos ou dentro do intervalo estabelecido como normal, que é de 38 $^{\circ}$ C a 40,5 $^{\circ}$ C, de acordo com Kolb (1987). Todavia, segundo McDowell et al. (1976), cada 1 $^{\circ}$ C ou menos de elevação na temperatura retal, pode ser o bastante para reduzir o desempenho na maioria das espécies de animais domésticos, inclusive os ovinos.

Após a avaliação das condições ambientais e dos parâmetros clínicos fisiológicos, nota-se que além da exposição dos animais a condições ambientais desfavoráveis, o tempo de exposição a estas condições tem grande influência sobre a manutenção da homeostasia destes. Por outro lado, destaca-se que as características climáticas da manhã e provavelmente da noite, podem ter auxiliado os animais fornecendo-lhes momentos de condições favoráveis à compensação homeostática. Pois, quando o

ITGU médio da época mais quente foi de 79,6 (ITGU 79,0 e 80,3 nos tratamentos com e sem oferta de sombra) no turno da manhã, os animais avaliados se encontravam em condições de conforto, sem alterações dos seus parâmetros clínicos e total controle da homeostase. Entretanto, ao serem continuamente expostos às condições ambientais adversas ao longo do dia, estes animais entraram em situação de estresse térmico, alterando seus parâmetros clínicos na tentativa de controlar sua homeostasia. Destaca-se que usando a TR e a FR como indicadores de estresse térmico calórico, o emprego do sombreamento artificial foi favorável as ovelhas. Isto explica o fato de um ITGU 80 às sete horas da manhã não alterar os parâmetros clínicos dos animais, e esta mesma condição ambiental (ITGU 80) no turno da tarde (Figura 2) alterar os parâmetros clínicos fisiológicos destes animais (tratamento com sombra nos meses jun/ago).

## Manifestação de estro

As respostas observadas (número de ovelhas em estro e intervalo de tempo entre retirada de esponja-estro) não sofreram interações entre as épocas do ano e a oferta de sombra artificial (Tabela 4). Assim como os percentuais de ovelhas que apresentaram sinais de estro, as médias de tempo entre a retirada de esponja e a manifestação de estro também não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) nos tratamentos com e sem sombra, independente da época estudada, com

valores de 86,3% e 23,8 horas vs 68,2% e 26,8 horas respectivamente.

O mesmo ocorreu nos meses de menores e maiores temperaturas (jun/ago e out/nov) com os percentuais de ovelhas que manifestaram sinais de estro, e as médias de tempo entre a retirada da esponja e a manifestação de estro ( $P > 0,05$ ), com valores de 86,3% e 24,5 horas x 68,2% e 26,1 horas, respectivamente, independentemente da presença ou não de sombra.

**Tabela 4.** Percentagem de manifestação de estro e tempo (média  $\pm$  desvio padrão) entre a retirada da esponja e a manifestação do estro das ovelhas submetidas à superovulação nos tratamentos com e sem sombra nas duas épocas do ano.

Avaliações	Jun/Ago		Out/Nov	
	C/Sombra	S/Sombra	C/Sombra	S/Sombra
Manifestação de estro (%)	90,9 (10/11)	81,8 (9/11)	81,8 (9/11)	63,6 (7/11)
Intervalo retirada-estro (h)	22,8 $\pm$ 6,8	26,2 $\pm$ 5,7	24,4 $\pm$ 6,8	27,4 $\pm$ 5,9

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ); Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

Naqvi et al., (2004), trabalhando com ovelhas Bharat Merino, caloricamente estressadas (câmara climática à 40°C, 6 horas por dia durante 4 semanas) e controle (condições ambientais do semiárido indiano), também não encontraram diferenças para estas variáveis, com valores próximos aos deste experimento. Entretanto, verificaram uma duração de estro significativamente menor (31,7 horas) para as ovelhas estressadas, quando comparada com a duração de estro do grupo controle (37,7 horas). Sawyer et al., (1979) encontraram redução significativa no número de ovelhas em estro quando estas estiveram sobre altas temperaturas ambientais 1,5 a 6 dias antes da data prevista do estro.

## Resposta à superovulação

As respostas das ovelhas ao protocolo superovulatório não sofreram interações entre o ambiente (com e sem sombra) e as épocas estudadas (jun/ago e out/nov), por isso serão apresentados separadamente nas tabelas 5 e 6.

As médias de ovulações das ovelhas submetidas ao protocolo de superovulação não foram influenciadas pela oferta de sombra ( $P > 0,05$ ). Contudo, as médias de ovulações foram diferentes nas distintas épocas do ano ( $P < 0,05$ ). As ovelhas que foram superovuladas durante jun/ago (época de temperaturas menores) tiveram maior média de ovulações do que as ovelhas superovuladas em out/nov (época de temperaturas mais elevadas) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação entre média  $\pm$  desvio padrão do número de ovulações e de folículos anovulatórios de ovelhas Santa Inês nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas estudadas (menores e maiores temperaturas).

Avaliações	Tratamentos		Épocas	
	C/Sombra	S/Sombra	Jun/Ago	Out/Nov
Número de ovelhas	22	22	22	22
Ovulação	8,1 $\pm$ 7,7	7,0 $\pm$ 10,0	9,7 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	5,3 $\pm$ 5,9 <sup>b</sup>
Fol. Anovulatórios	0,6 $\pm$ 1,1	0,6 $\pm$ 1,6	0,8 $\pm$ 1,6	0,4 $\pm$ 1,0

Médias seguidas de letras diferentes na linha (entre épocas) diferem estatisticamente pelo teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade; Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

Fica evidente, que as condições ambientais oferecidas através do sombreamento ao longo do experimento, principalmente no turno da tarde, não foram suficientes para influenciar na resposta ao tratamento superovulatório dos animais. Provavelmente porque a redução da temperatura do ar, proporcionada pelo sombreamento tenha sido muito pequena (apenas 2,0°C). Enquanto que a diferença das temperaturas do ar entre as diferentes épocas do ano foi de 5,4°C, no mesmo horário.

Gomes (2011), também trabalhando com ovelhas Santa Inês, encontrou diferença para médias de ovulações entre tratamentos climáticos, com 10°C de diferença de temperaturas do ar entre os tratamentos (24°C x 34°C, e 50% UR), com médias de 4,6 ovulações no conforto (24°C e 50% UR) e 2,9 ovulações no estresse térmico (34°C e 50% UR), mostrando que a temperatura do ar exerce grande influência sobre as respostas superovulatórias. Por outro lado, a diferença entre as médias de ovulações de ovelhas Bharat Merino encontradas por Naqvi et al. (2004) nos grupos controle a campo (Ta de 34,6 °C e UR de 60,7%) e exposto ao calor em câmara (Ta de 40,0°C e UR de 58,4%) não foi significativa, com médias de 8,1  $\pm$  1,2 ovulações no grupo controle e 6,7  $\pm$  1,1 no grupo exposto ao calor em sala climatizada. Estas médias encontradas por Naqvi et al. (2004) foram muito próximas às encontradas nos tratamentos com e sem sombra deste experimento (Tabela 5).

Alguns estudos vêm mostrando evidências, de que o *status* ovariano no início do tratamento com FSH está diretamente ligado ao sucesso ou não das taxas de ovulações, em protocolos de superovulação de ovelhas (González-Bulnes et al., 2000, 2004, 2005). Ou seja, o número de ovulações, depende da quantidade de folículos responsáveis ao FSH presentes nos ovários, no momento do início da superovulação. No entanto, com a utilização de protocolos convencionais (como neste experimento), a população folicular existente no início do tratamento com FSH é desconhecida. Razão pela qual, os resultados encontrados para superovulação neste experimento (de zero a 35 ovulações), e outros, possam variar tanto dentro do mesmo manejo e tratamento superovulatório.

A média de folículos anovulatórios não sofreu influência ( $P > 0,05$ ), nem do sombreamento artificial, nem da época do ano em que as ovelhas foram superovuladas (Tabela 5). A presença de folículos anovulatórios em programas de superovulação de ovelhas é bastante comum, e apresentam causas variadas. Entretanto, sabe-se que muitas destas causas estão relacionadas a deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) (González-Bulnes et al., 2003).

Outra causa da ocorrência de folículos anovulatórios em programas de superovulação, pode ser a alta dose de FSH

exógeno aplicado nos animais. Podendo esta, interferir no eixo endócrino e reduzir a secreção de LH endógeno, ou promover pico pré-ovulatório de LH em momento inadequado (Noel et al., 1994; Kendall et al., 2004).

### Produção de embriões

Os resultados descritos na tabela 6 são referentes à taxa de recuperação, a média de estruturas recuperadas, média de oócitos recuperados (estruturas não fertilizadas), média de embriões recuperados, média de embriões viáveis, percentagens de embriões viáveis e degenerados, das ovelhas superovuladas nos dois tratamentos (com e sem sombra), e nas duas distintas épocas do ano. Como estas variáveis também não apresentaram interações entre os tratamentos e as épocas do ano, elas também foram analisadas em cada condição separadamente (Tabela 6). Entretanto, todas estas variáveis descritas não tiveram

influência significativa ( $P > 0,05$ ), nem da oferta de sombra nos piquetes, nem das épocas do ano.

A taxa de recuperação foi calculada pela relação entre o número de estruturas coletadas, e o número de corpos lúteos presentes nas ovelhas coletadas. A maior diferença encontrada para as taxas de recuperação foi entre as épocas do ano, com percentuais variando de 70,4 a 77,5%, porém, não significativa ( $P > 0,05$ ). Esta diferença foi muito pequena, quando comparada com as taxas de recuperação de ovelhas encontradas na literatura. Gomes (2011) obteve recuperação de 34,6% versus 25,3% de estruturas com ovelhas Santa Inês em condições de conforto e estresse térmico respectivamente. Varago (2009) recuperou de ovelhas Santa Inês, 18,6 e 34,3% de estruturas ovuladas nas estações primavera/verão e outono/inverno respectivamente.

**Tabela 6.** Produção de embriões de ovelhas Santa Inês submetidas à superovulação a pasto nos tratamentos (com e sem sombra) e nas épocas estudadas (jun/ago e out/nov).

Avaliações	Tratamentos		Épocas	
	C/Sombra	S/Sombra	Jun/Ago	Out/Nov
Taxa recuperação (%)	72,9 (102/140)	73,3 (96/131)	70,4 (119/169)	77,5 (79/102)
Estruturas recuperadas	4,8 ± 6,0	4,4 ± 7,6	5,5 ± 8,0	3,6 ± 5,3
Oócitos	1,2 ± 2,6	1,3 ± 3,9	2,1 ± 4,3	0,5 ± 1,5
Embriões	3,5 ± 5,0	3,0 ± 6,2	3,5 ± 6,2	3,1 ± 5,1
Embriões viáveis	3,0 ± 3,9	2,9 ± 5,8	3,0 ± 5,5	2,9 ± 4,3
Embriões viáveis (%)	84,4 (65/77)	95,5 (64/67)	88,0 (66/75)	91,3 (63/69)
Emb. degenerados (%)	15,6 (12/77)	4,5 (3/67)	12,0 (9/75)	8,7 (6/69)

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ); Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

Existem diversos fatores que podem interferir na taxa de recuperação de embriões em ovinos, tais como o método de coleta, a experiência do técnico que realiza o procedimento, a regressão prematura de corpo lúteo, o hormônio utilizado para induzir a superovulação e a variação individual de cada animal (Scudamore et

al., 1991; Andrioli et al., 1999; Varago, 2009).

As médias de estruturas recuperadas, assim como as médias de embriões, apesar de não terem sofrido influência significativa das condições climáticas observadas nos tratamentos e nas épocas do ano,

apresentaram tendência de melhores resultados para os animais tratados com sombra (médias de  $4,8 \pm 6,0 \times 4,4 \pm 7,6$  estruturas e  $3,5 \pm 5,0 \times 3,0 \pm 6,2$  embriões para os grupos com e sem sombra respectivamente) e superovulados em jun/ago, com menor amplitude térmica (médias de  $5,5 \pm 8,0 \times 3,6 \pm 5,3$  estruturas e  $3,5 \pm 6,2 \times 3,1 \pm 5,1$  embriões para os meses jun/ago e out/nov respectivamente). Gusmão et al. (2007) encontraram em média  $6,2 \pm 7,0$  estruturas recuperadas, e  $3,7 \pm 4,5$  embriões viáveis, em ovelhas Santa Inês superovuladas.

Os efeitos do estresse térmico sobre as médias de embriões produzidos, bem como sobre as médias e taxas de embriões viáveis não foram visíveis neste estudo. Principalmente nos grupos sem sombra e superovulados na época mais quente, onde os valores do ITGU, utilizados para medir o grau de desconforto do ambiente térmico sobre os animais, apresentaram valores considerados altos no turno da tarde ( $95,4$  e  $95,7$  respectivamente) até mesmo para ovinos. Duas possíveis explicações para estas diferentes condições de estresse térmico não terem afetado, nem a produção de embriões, nem a qualidade destes, são: (1) A magnitude das condições térmicas

impostas a esses animais não foi suficientemente alta para prejudicar o desenvolvimento embrionário, ou (2) a adaptabilidade das ovelhas Santa Inês as altas temperaturas do ambiente, encontradas neste experimento, foi suficiente para não prejudicar o desenvolvimento embrionário nestas condições. A raça Santa Inês foi desenvolvida e criada ao longo dos anos, através do cruzamento de duas raças bastante resistentes as temperaturas (Morada Nova e Bergamácia) na região do semiárido nordestino, e, portanto, está aclimatada a ambientes quentes.

A proporção entre mórulas e blastocistos dos embriões viáveis coletados, teve influência tanto do sombreamento, quanto da interação entre a presença de sombreamento e época do ano. A proporção de mórulas foi maior que a de blastocistos para as ovelhas com sombra na época de menores temperaturas e para as ovelhas com e sem sombra na época de temperaturas mais elevadas ( $P < 0,05$ ). As ovelhas que estavam no tratamento sem sombra superovuladas na época mais fresca, não tiveram diferença significativa entre as proporções de mórula e blastocistos entre os embriões viáveis produzidos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Distribuição dos embriões viáveis quanto a seu estágio de desenvolvimento em cada tratamento nas épocas de menores e maiores temperaturas ambientais.

Avaliações	Jun/Ago		Out/Nov	
	C/Sombra	S/Sombra	C/Sombra	S/Sombra
Mórula (%)	92,0 <sup>Aa</sup> (23/25)	58,5 <sup>Ca</sup> (24/41)	80,0 <sup>ABa</sup> (36/40)	60,9 <sup>BCa</sup> (14/23)
Blastocisto (%)	8,0 <sup>Cb</sup> (2/25)	41,5 <sup>Aa</sup> (17/41)	20,0 <sup>BCb</sup> (4/40)	39,1 <sup>ABa</sup> (6/23)

Médias seguidas de letras diferentes maiúscula na linha, e minúscula na coluna, diferem pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ); Jun/Ago = época de menores temperaturas; Out/Nov = época de maiores temperaturas.

O grupo de ovelhas do tratamento com sombra, nos meses jun/ago (menores temperaturas), teve maior proporção significativa de mórulas que o grupo sem sombra em ambas as épocas ( $P < 0,05$ ), mas não apresentou diferença entre época, nas

mesmas condições de sombreamento ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, a proporção de blastocistos entre os embriões viáveis, foi maior no grupo de ovelhas sem sombra, também superovulada nos meses jun/ago, quando comparada ao grupo de ovelhas

com sombra em ambas as épocas. Este grupo de ovelhas, também não apresentou diferença entre as proporções de blastocisto nas mesmas condições ambientais entre as diferentes épocas em que foram superovuladas.

A grande variabilidade entre as respostas aos protocolos de superovulação (taxa de ovulação e produção de embriões) é sem dúvida o maior estrangulamento para o aumento da eficiência dos programas de transferência de embriões em ovinos. Neste trabalho, pode-se observar através das médias e seus desvios, que as variáveis relacionadas às respostas superovulatórias e produção de embriões, apresentaram ampla variação individual entre os animais, independentemente dos tratamentos, ou épocas do ano em que foram submetidos aos protocolos de superovulação.

Apesar dos grandes avanços técnicos realizados na tentativa de reduzir ou eliminar esses fatores, a variação da resposta a superovulação ainda continua a limitar o uso dos programas de superovulação em ovelhas de forma comercial.

## CONCLUSÕES

As temperaturas mais elevadas do turno da tarde nos meses de outubro e novembro alteram os parâmetros fisiológicos da frequência respiratória e da temperatura retal nas ovelhas Santa Inês no semiárido.

As temperaturas mais quentes nos meses de outubro e novembro no semiárido promovem redução nos números de ovulações.

O sombreamento artificial não influencia as respostas superovulatórias e a produção de embriões viáveis pelas ovelhas Santa Inês.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, I. S.; SOUZA, B. B.; PEREIRA FILHO, J. M. et al. Parâmetros fisiológicos e desempenho de ovinos Santa Inês submetidos a diferentes tipos de sombreamento e a suplementação em pastejo. *Ciê.n.Agrot.*, v.31, n.2, p.540-547, 2007.

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; SOARES, A. T. et al. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, n.3, p.136-143, 1999.

BUFFINGTON, D. E.; COLLAZO-AROCHO, G. H.; CANTON, D. et al. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Am. Soc. of Agric. Engin.*, v.24, p.711-714, 1981.

CEZAR, M. F.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H. et al. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. *Ciê.n.Agrot.*, v.28, n.3, p.614-620, 2004.

COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. v.59, p.171-188, 2003.

GHARBI, I.; FERROUK, M.; DECHICHA, A. et al. Follicular Status and Embryo Production in Ouled Djellal (Algeria) Ewes Breed Pretreated with a GnRH Agonist. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, v.7, n.2, p.117-127. 2012.

- GONZÁLES-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A. et al. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.35, p.65-68, 2000.
- GONZÁLES-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; SANTIAGO-MORENO, J. et al. Reproductive Season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatment in ewes. *Theriogenology*, v.60, p.281-288, 2003.
- GONZÁLES-BULNES, A.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K. et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fert. Develop.*, v.16, p.421-435, 2004.
- GONZÁLES - BULNES, A.; BERLINGUER, F.; COCERO, M. J. et al. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. *Theriogenology*, v.64, p.1392-1403, 2005.
- GORDON, I., 1997. *Embryo transfer and associated techniques in sheep*. In: Controlled Reproduction in Sheep and Goat, CAB International, Oxon, UK.
- GOMES, M. G. T. *Influência do ambiente térmico e de diferentes dietas na superovulação e nos parâmetros fisiológicos de ovelhas Santa Inês*. 2011. 243p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.
- GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; QUINTELA, A. et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no semiárido nordestino. *Rev. Bras. Saúde Reprod. Anim.*, v.8, p.1-10, 2007.
- HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M. et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, v.55, p.91–103, 2001.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Pecuária Municipal. 2011. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm)>. Acesso em 16/04/2013.
- JOHNSON, H. D. Environmental management of cattle to minimize the stress of climatic change. *Int. J. Biometeorol.*, v.24, p.65-78, 1980.
- KENDALL, N. R.; GONZALEZ-BULNES, A.; CAMPBELL, B. K. et al. The use of urinary and recombinant human FSH preparations to induce superovulation in sheep and the effect on FSH and LH concentrations. *Annual Meeting Brit Society Animal Science*, v. 59, 2004.
- KOLB, E. *Fisiologia veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 1115p.
- McDOWELL, R. E.; HOOVEN, N. W.; CAMOENS, J. K. et al. Effects of climate on performance of Holsteins in first lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 59, p. 965-973, 1976.
- NAQVI, S. M. K.; MAURYA, V. P.; GULYANI, R. et al. The Effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Rum. Res.* v.55, p.57-63, 2004.
- NÖEL, B.; BISTER, J. L.; PIERQUIN, B. et al. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in

Suffolk ewes. *Theriogenology*, v.41, p.719–27, 1994.

OLIVEIRA, F. M. M.; DANTAS, R. T.; FURTADO, D. A. et al. Parâmetros de conforto térmico e fisiológico de ovinos Santa Inês, sob diferentes sistemas de acondicionamento. *Rev. Bras. Eng. Agri. Amb.*, v.9, n.4, p.631-635, 2005.

OLIVEIRA, M. E. F. *Efeito da administração do LH ao final do tratamento superestimulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês*. 2008. 67f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

OLIVEIRA, M. E. F. *Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas Santa Inês*. 2011. 101f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

QUESADA, M.; McMANUS, C.; COUTO, F. A. D. Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no Distrito Federal. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.30, n.3 (sup 1), p.1021-1026, 2001.

RIBEIRO N. L.; FURTADO D. A.; MEDEIROS A. N. et al. Avaliação dos índices de conforto térmico, parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de ovinos nativos. *Eng. Agríc.*, v.28, n.4, p.614-623, 2008.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.*, v.45, p.523-532, 1991.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. 1999. Certification and Identification of Embryos. In: *Manual of the International Embryo*

*Transfer Society*, 3. ed. The Society, Champaign, IL., USA., pp: 109-122.

SAWYER, G. J. The influence to radiant heat load in Merino ewes. II. The relative effects of heating before and after insemination. *Austral. J. Agric. Res.*, v.30, p.1143–1149, 1979.

SANTOS, J. R. S.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H. et al. Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semiárido nordestino. *Ciênc. Agrotec.*, v.30, n.5, p.995-1001, 2006.

SCUDAMORE, C. L.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P. The effect of timing of laparoscopic insemination in superovulated ewes, with or without sedation, on the recovery of embryos, their stage of development and subsequent viability. *Theriogenology*, v.35, n.5, p.907-914, 1991.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, v.67, p.1-18, 2000.

STARLING, J. M. C., SILVA, R. G., MUNÕZ, M. C. et al. Análise de algumas variáveis fisiológicas para avaliação do grau de adaptação de ovinos submetidos ao estresse por calor. *Rev. Bras. Zootecn.*, v.31, n.5, p.2070-2077, 2002.

TERVIT, H. R. e HAVIK, P. G. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zeal. Vet. J.*, v.24, p.138-140, 1976.

VARAGO, F. C. *Superovulação em ovelhas da raça Santa Inês e criopreservação de embriões*. 2009. 80f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração os resultados encontrados nos quatro experimentos realizados, foi verificado que a média do percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normal e a de folículos em crescimento, assim como a média dos diâmetros dos oócitos e folículos presentes nos ovários no momento das ovariectomias não foram diferentes entre as épocas do ano. Contudo, após sete dias de cultivo, todos os grupos testados, independente da presença ou não de FSHr no meio de cultivo, apresentaram taxas médias de sobrevivência dos folículos pré-antrais e de ativação dos folículos primordiais maiores no período do ano em que a temperatura do ar atingiram suas maiores médias. Como não podemos dizer que condições climáticas mais adversas encontradas nesta época (temperaturas mais elevadas), seja responsável pela melhora nestes resultados, sugere-se que possa ter ocorrido interferência das melhores condições de escore corporal encontrada nos animais nesta época;

No experimento realizado na câmara climatizada, as condições ambientais adversas proporcionadas pelo tratamento calor, reduziram o número de folículos aspiráveis e a taxa de recuperação dos complexos cumulus-oócito na primeira seção de aspiração, ocasionando menor obtenção de complexos cumulus-oócito. Além disso, as condições ambientais e as repetidas seções de aspiração nas ovelhas estressadas pelo calor, também promoveram redução do crescimento folicular, a cada repetição das aspirações, levando ao surgimento de maior proporção de folículos pequenos na última seção de aspiração. Contudo, não prejudicou a viabilidade dos complexos cumulus-oócito a maturação *in vitro*, nem interferiu na proporção de oócitos em apoptose (TUNEL-positivo);

A falta de sombreamento, e as temperaturas mais elevadas encontradas no turno da tarde durante os meses de outubro e novembro, alteram significativamente os parâmetros fisiológicos de frequência respiratória e de temperatura retal das ovelhas Santa Inês, quando mantidas a pasto, na região semiárida. Além disso, as condições climáticas mais adversas encontradas nesta época, também prejudica o desempenho reprodutivo destas ovelhas, através da redução das taxas de ovulações. Contudo, a compensação homeostática realizada por essas ovelhas em momentos de condições ambientais favoráveis durante a noite, permitiu às ovelhas, não apresentar diferenças entre as condições ambientais testadas, na manifestação de estro e na produção de embriões, independentemente da presença ou não de sombreamento artificial ou das épocas do ano estudadas.

## **ANEXOS**

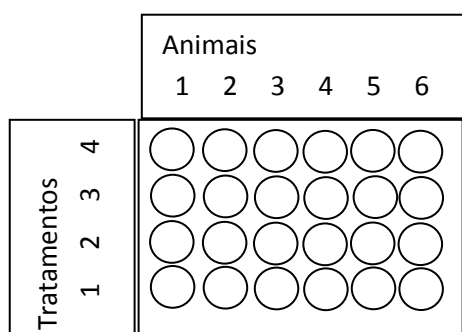
## Anexo-I

### PROTOCOLO PARA CULTIVO *IN SITU* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

#### Preparo das placas para cultivo *in situ*:

As placas devem ser preparadas pelo menos 3 horas antes da coleta ou com meio previamente equilibrado, com no mínimo 1 hora de antecedência ao procedimento.

As placas para cultivo de fragmentos (cultivo *in situ*) são as placas com 24 poços. Estas placas devem ser preparadas colocando-se 1 ml de meio de cultivo em cada poço com uma pipeta sorológica estéril descartável (25 ml). A depender do número de tratamentos, preparar 1 placa para cada 6 animais/ 4 tratamentos ou 4 animais / 6 tratamentos. Veja o exemplo:



- Se o número de tratamentos/animais for superior, poderá ser feito o inverso, ou ainda, utilizar duas ou mais placas para distribuição do experimento;
- As placas devem ser preparadas na câmara de fluxo laminar;
- Com cuidado para na hora da pipetagem não encostar a ponta da pipeta ou ponteira nas bordas dos poços/placa;
- Caso aconteça, trocar imediatamente a pipeta/ponteira;
- Não falar na hora da montagem das placas para evitar contaminação;
- Colocar a placa para equilibrar por no mínimo 2 hs antes da coleta;
- Caso o meio esteja estabilizado, após montagem da placa, deixar equilibrando por pelo menos 30 minutos.

Para o cultivo *in situ* com duração de sete dias, deverão ser feitas réplicas das placas para os dias 1 e 7, que serão retiradas nos dias respectivos para fixação e processamento histológico ou para eletrônica. Os poços devem ser checados quanto à contaminação a cada dia da troca, que deve ser realizada a cada dois dias de cultivo.

O meio de cultivo suplementado e filtrado deve ser colocado para equilibrar na incubadora de CO<sub>2</sub> após um período mínimo de 2 horas a depender do volume a ser utilizado. No caso de um volume acima de 20 ml, deve-se manter em equilíbrio por no mínimo 2 hs para atingir a temperatura de 39 °C e o pH ideal. Vale ressaltar que o meios conservados em geladeira encontram-se de 4 a 8° C e para atingir a temperatura de 39 °C leva um tempo prolongado a depender do volume a ser equilibrado.

**Anexo-II**

**COLORAÇÃO HISTOLÓGICA EM ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF – PAS**

<b>Etapa</b>	<b>Reagente</b>	<b>Tempo</b>
<b>Desparafinização</b>	Xilol desparafinizador I	15 min
	Xilol desparafinizador II	15 min
<b>Hidratação</b>	Álcool absoluto I (100%)	1 min
	Álcool absoluto II (100%)	1 min
	Álcool absoluto III (100%)	1 min
	Álcool 90%	1 min
	Álcool 80%	1 min
	Álcool 70%	1 min
	Banho com água destilada ou da torneira (tirar excesso do álcool)	-
<b>Coloração</b>	Ácido periódico	10 - 15 min
	Água destilada	2 banhos
	Reativo de Schiff	10 - 17 min
	Solução sulfurada	1 - 2 min
	Banho com água corrente (torneira)	5 min
	Hematoxilina	1 min – 2 min
	Banho com água corrente (torneira)	5 min
<b>Desidratação</b>	Álcool 70%	1 min
	Álcool 80%	1 min
	Álcool 90%	1 min
	Álcool absoluto I	1 min
	Álcool absoluto II	1 min
	Álcool absoluto III	1 min
<b>Diafanização</b>	Xilol I	1 min
	Xilol II	1 min
	Xilol III	1 min
<b>Montagem</b>	Bálsamo do Canadá	-

**Anexo-III**

**MEIO PARA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM OVELHAS**

Preparado por: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Componentes	mM	10 mL	15 mL	30 mL
TCM 199 (HEPES)		10 ml	15 ml	30 ml
Peni/Estrepto		100 µl	150 µl	300 µl
BSA		0,01 g	0,015 g	0,03 g
Hemofol		50 µl	75 µl	150 µl

1. Adicionar todos components para a solução e agitar gentilmente até dissolução.

2. Ajustar pH para 7.2 - 7.4

Inicial (pH): \_\_\_\_\_ Final (pH): \_\_\_\_\_

3. Ajustar a osmolaridade para 283 mOsm

Inicial (mOsm): \_\_\_\_\_ Final (mOsm): \_\_\_\_\_

4. Filtrar e estocar a 4°C por até duas semanas.

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Anexo-IV****FICHA PARA CONTROLE DE ASPIRAÇÃO****Identificação**

Ovelha:	Data:
Tratamento:	Dose:

**Programa**

	D0	D7	D8	D10
Tarde (13:00h)	Esponja	1,0 mL PGF2 $\alpha$	70 UI FSH + 300 UI ECG	LOPU

**Foliculos**

	Fol. > 5mm	Fol. > 2 < 5mm	Fol. < 2mm	Outras
Ovário Dir.:				
Ovário Esq.:				

**Aspirados:**

Totais	Nº de Foliculos	Nº de Oócitos Recuperados	Grau-I	Grau-II	Grau-III	Desnudos
Ovário Dir.:						
Ovário Esq.:						

**Anestesia:**

Droga	Dose	Horas	Observação
Atropina	0,05 mg/Kg(SC)		
Xilazina	0,2 mg/Kg (IM)		
Lidocaína			
Ketamina	1 - 2 mg/Kg (IV)		

OBS: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_