

UFRRJ
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da Perfusão Vascular e da Concentração de Colesterol e
Estrógeno em Folículos Pré-Ovulatórios de Éguas Mangalarga Marchador
Submetidas às Condições de Desconforto Térmico**

Daniela de Mello

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO VASCULAR E DA CONCENTRAÇÃO
DE COLESTEROL E ESTRÓGENO EM FOLÍCULOS
PRÉ-OVULATÓRIOS DE ÉGUAS MANGALARGA MARCHADOR
SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DE DESCONFORTO TÉRMICO**

DANIELA DE MELLO

Sob a Orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

e Co-orientação do Professor
Júlio César Ferraz Jacob

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Junho de 2015

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dM527a de Mello, Daniela , 1989-
Avaliação da Perfusão Vascular e da Concentração de Colesterol e Estrógeno em Foliculos Pré-Ovulatórios de Éguas Mangalarga Marchador Submetidas às Condições de Desconforto Térmico / Daniela de Mello. - 2015.
26 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
Coorientador: Júlio César Ferraz Jacob.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, 2015.


1. Reprodução animal. 2. Adaptabilidade. 3. Estresse Térmico. 4. Aspiração Folicular. 5. Equinos. I. Roberto Bourg de Mello, Marco, 1971-, orient. II. César Ferraz Jacob, Júlio , 1961-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. IV. Título.

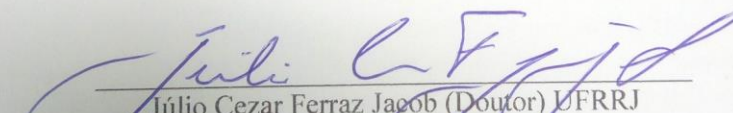
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

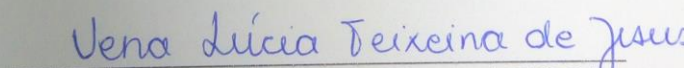
DANIELA DE MELLO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em CIÊNCIAS CLÍNICAS.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/06/2015.


Marco Roberto Bourg de Mello (Doutor) UFRRJ
(Orientador)


Júlio Cezar Ferraz Jacob (Doutor) UFRRJ
(Co-Orientador)


Vera Lúcia Teixeira de Jesus (Doutora) UFRRJ


Felipe Zandonadi Brandão (Doutor) UFF

“Percebe e entende que os melhores amigos
São aqueles que estão em casa, esperando por ti
Acredita nos momentos mais difíceis da vida
Eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar.”

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pela compreensão sem igual e amor incondicional,
com toda minha gratidão e amor!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado por onde quer que eu ande. Por tornar minha caminhada leve, mesmo nas horas mais difíceis e me fazer acreditar que levantar é sempre a melhor escolha.

Agradeço também aos meus pais, por serem meu porto seguro, meu amor sem medidas, meu equilíbrio. Aos meus irmãos e as minhas sobrinhas, principalmente, por serem a melhor parte de mim e pelo amor tão puro que me dedicam.

Ao meu orientador, Professor Marco Roberto Bourg de Mello, por todas as conversas, orientações, paciência e atenção. E ao meu co-orientador, Professor Julio César Ferraz Jacob, pelo convite para que eu viesse a fazer o mestrado e atenção.

Aos colegas e amigos de pós-graduação que tanto contribuíram com meu trabalho e acrescentaram na minha formação, por terem tornado as horas do experimento e várias outras mais leves, pelas conversas e risadas: Marcella, Marcus, Gabriel e Jhonnatha.

Aos estagiários que disponibilizaram tempo e não mediram esforços em ajudar com o que lhes era pedido: Bruna, Lara, Carlinha e Girino.

Aos funcionários, pois sem eles o trabalho se tornaria um tanto maior e as risadas um tanto menores: Sr. Zico, Sr. Luiz, Micuim e Diogo.

Ao Professor Felipe Zandonadi Brandão da Universidade Federal Fluminense (UFF) pelo auxílio e disponibilidade com a realização da dosagem de estrógeno. Às residentes da Patologia Clínica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo auxílio com a dosagem de colesterol.

Ao Professor Luís Fernando Dias Medeiros, pelo auxílio e atenção com o delineamento bioclimático do experimento. E ao Professor Celso, por ter em muito me auxiliado com a análise estatística do experimento.

As ex-colegas de casa e amigas, por terem estado ao meu lado em boa parte da minha caminhada durante o mestrado: Uiara e Lara. E a atual colega de casa e amiga, Naira, por ter me acolhido tão bem, pelas horas de conversa, conselhos e por fazer com que eu realmente me sinta em casa.

Aos amigos, de ontem, hoje e sempre, que mesmo longe se fazem tão presentes. Por toda a amizade e carinho que sempre me dedicaram: Lê, Gahbi e Luiz.

Ao meu namorado, Luiz Leoni e toda a família Leoni, por terem me acolhido e cuidado de mim com tanto carinho.

Aos cães mais lindos do mundo, pelo amor mais simplório e sincero. Pela companhia mais gostosa: Sid e Ágata.

Muito Obrigada!

RESUMO

MELLO, Daniela de. **Avaliação da perfusão vascular e da concentração de colesterol e estrógeno nos folículos pré-ovulatórios de éguas Mangalarga Marchador submetidas às condições de desconforto térmico.** 2015. 19f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o padrão de perfusão sanguínea de folículos dominantes submetidos à indução da ovulação com hCG por meio da ultrassonografia Collor Doppler e os níveis de colesterol e estrógeno em folículos pré-ovulatórios de éguas submetidas ou não ao desconforto térmico. Para tanto, 15 ciclos estrais de éguas distribuídas aleatoriamente entre os grupos conforto (Grupo I) e desconforto térmico (Grupo II) foram acompanhados por ultrassonografia transretal periodicamente até que o maior folículo atingisse diâmetro maior ou igual a 32 mm, momento no qual as éguas receberam 1000 UI de Chorulon® (hCG), e tiveram o folículo pré-ovulatório acompanhado por ultrassonografia Doppler de 6 em 6 horas, até 24 horas, momento em que foram realizadas as aspirações do fluido folicular para dosagem de colesterol e de estrógeno. A perfusão vascular folicular foi estimada de maneira subjetiva levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos. O fluido folicular aspirado foi recuperado em frascos tipo Erlenmeyer, posteriormente colocado em tubo Falcon de 50 ml e centrifugado a 1000 G por 15 minutos, sendo o sobrenadante recuperado e armazenado em criotubos a -20 °C até que a dosagem de estrógeno e de colesterol fosse realizada. Para caracterizar o ambiente térmico foi usado o teste do índice de temperatura e umidade (ITU) segundo Hansen (2005), e para caracterizar a adaptação dos animais ao ambiente térmico foi utilizado o coeficiente de tolerância ao calor (CTC) e o coeficiente de adaptabilidade (CA), segundo Martins Jr. (2004). O ITU médio encontrado para o período analisado (março e abril de 2014) foi de 58,33, o que não caracteriza ambiente estressante para os animais. Após análise dos dados bioclimáticos, foram encontrados valores médios de CTC do Grupo I, 95,47 e do Grupo II, 87,14, sendo diferentes entre si ($p < 0,05$), apontando uma tolerância maior do Grupo I quando comparado ao Grupo II. A média de CA encontrada para o Grupo I foi de 3,84 e para o Grupo II de 4,29, valores que diferiram entre si, estatisticamente ($p < 0,05$), mostrando uma maior adaptabilidade do Grupo I em relação ao Grupo II. Os valores médios de perfusão vascular dos folículos pré-ovulatórios foram: Grupo I: H0=32,5%; H6=43,75%; H12=41,85%; H18=33,75%; H24=42,5%; Grupo II: H0=24,85%; H6=41,42%; H12=48,57%; H18=38,57%; H24=47,14%. Não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos quanto ao percentual de perfusão vascular folicular. Os valores médios de colesterol e de estrógeno para os Grupos I e II foram, respectivamente, 51,62mg/ml e 46,14mg/ml e 325.739,64pg/dL e 316.381,05pg/dL. Não observando diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Estes resultados demonstram que ambientes que privam os animais de sombra são passíveis de gerar desconforto térmico, ainda que os índices não apontem ambiente estressante para o animal. No entanto, esse desconforto não foi o suficiente para prejudicar, a esteroidogênese ou percentual de vascularização folicular em 24 horas.

Palavras-chave: Ambiente térmico. Ultrassonografia Doppler. Reprodução equina.

ABSTRACT

MELLO, Daniela. **Evaluation of vascular perfusion and cholesterol and estrogen concentrations in Mangalarga Marchador mares pre-ovulatory follicles submitted to conditions of thermal discomfort.** 2015. 19f. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Institute of Veterinary medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The aim of this study was to evaluate the pattern of blood perfusion of dominant follicles undergoing ovulation induction with hCG by ultrasound Collor Doppler, and cholesterol and estrogen concentrations in pre-ovulatory follicles of mares submitted or not to thermal discomfort. Therefore, estrous cycles of 15 mares were randomly distributed between comfort (Group I) and thermal discomfort (Group II) groups and monitored by transrectal ultrasonography periodically until the largest follicle reached greater than or equal to 32mm diameter, at which the mares were given 1000IU of Chorulon® (hCG), and had the preovulatory follicle accompanied by Doppler ultrasound 6-6horas up to 24 hours, at which time the aspirations were taken from the follicular fluid of cholesterol and estrogen dosing. The follicular vascular perfusion was estimated subjective basis, taking into account the percentage of the circumference of the follicular wall with Collor Doppler signals. Aspirated follicular fluid was recovered in Erlenmeyer flasks to subsequently place in a 50ml Falcon tube and centrifuged at 1000G for 15 minutes, and the supernatant recovered and stored in cryovials at -20°C until the estrogen dosage and cholesterol were performed. To characterize the thermal environment was used the test temperature and humidity index (THI) by Hansen (2005), and to characterize the adaptation of animals to the thermal environment was used to heat tolerance coefficient (CTC) and the adaptability coefficient (AC), according to Martin, Jr. (2004). The average THI found for the analyzed period (March and April / 2014) was 58.33, which does not characterize stressful environment for the animals. After bioclimatic analysis found CTC average values of Group I and Group II 95.47, 87.14, these averages were statistically different ($p < 0.05$), indicating a greater tolerance of Group I when compared to Group II. The AC average found for the group I was 3.84 and the Group II 4.29, values that differed statistically ($p < 0.05$), showing greater adaptability in Group I compared to Group II. The average values of vascular perfusion of preovulatory follicles were: Group I: H0=32.5%; H6=43.75%; H12=41.85%; H18=33.75%; H24=42.5%; Group II: H0=24.85%; H6=41.42%; H12=48.57%; H18=38.57%; H24=47.14%. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the percentages of follicular vascular perfusion between the groups in the analyzed moments. The mean values of cholesterol and estrogen for Groups I and II were respectively 51.62mg/ml and 46.14mg/ml and 325739.64pg/dL and 316381.05pg/dL. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between groups. These results demonstrate that environments that deprive the shadow animals are likely to generate thermal discomfort, even if the indices do not point stressful environment for the animal. However, this discomfort is not enough to harm steroidogenesis or percentage follicular vascularization in 24 hours.

Keywords: Thermal environment. Doppler ultrasound. Equine reproduction

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Ciclo Estral Equino.....	2
2.2 Indução da Ovulação	4
2.3 Ultrassonografia Doppler	6
2.4 Estresse Térmico.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Local, Período do Experimento, Animais e Manejo	9
3.2. Ultrassonografia Doppler e Aspiração Folicular	9
3.3 Dosagem Hormonal.....	10
3.4 Avaliação Bioclimática	11
3.5 Análise Estatística	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÕES	18
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura no Brasil teve um crescimento significativo nos últimos anos, possibilitando o aperfeiçoamento de técnicas na área reprodutiva, de modo a melhorar a genética e expansão comercial do setor. O sucesso reprodutivo está diretamente ligado a fatores externos, como temperatura, estresse, fotoperíodo e nutrição, já que todos eles têm influência direta sobre a dinâmica folicular. Regiões caracterizadas por altas temperaturas, principalmente no verão, fazem com que os animais sofram adaptações fisiológicas e comportamentais para manter a homeotermia. Dentre as adaptações ocorrem alterações dos parâmetros fisiológicos, endocrinológicos, bem como do comportamento de ingestão de alimento e água. Como a reprodução é um processo de demanda energética considerável, é diretamente afetado por essas alterações. Estudos sobre a influência do clima sobre na reprodução equina estão relacionados principalmente ao fotoperíodo. Entretanto, condições climáticas desfavoráveis podem desencadear um processo de estresse térmico e levar a alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, determinando queda ou insucesso reprodutivo.

O crescimento acelerado do plantel equino determina a necessidade de medidas que minimizem o impacto negativo das intempéries, uma vez que, ao considerarmos a estacionalidade reprodutiva da égua, qualquer interferência na fisiologia reprodutiva, durante a estação de monta, significa prejuízo. Estes interferentes como o desconforto térmico devem ser mais estudados para que medidas preventivas possam ser adotadas no manejo dos animais. Diferente do que já vem acontecendo com os estudos em outras espécies de mamíferos, os estudos relacionados à atividade reprodutiva da égua, no que diz respeito ao clima, se dedicaram a avaliação dos efeitos da sazonalidade reprodutiva e no desenvolvimento de técnicas voltadas a prolongar a ciclicidade de éguas na estação de monta. Sabe-se que as condições climáticas de desconforto provocam distúrbios reprodutivos em função do estresse climático e seus efeitos sobre a endocrinologia da reprodução de outras espécies. Com a diminuição da liberação das gonadotropinas (LH e FSH), a produção de estrógenos é alterada, pois afeta a capacidade esteroidogênica dos folículos e da dinâmica folicular ovariana. Altera ainda a expressão do RNAm de receptores de colesterol em células ovarianas, bem como, as concentrações de colesterol e ácidos graxos no fluido folicular ovariano de folículos de vários tamanhos como observado por Argov et al. (2005) em vacas.

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

A ausência de estudos sobre a atividade reprodutiva das éguas sob condições de desconforto ambiental torna essa avaliação necessária para que um manejo mais eficiente possa ser realizado de modo a minimizar os efeitos do estresse térmico sobre a reprodução da espécie e incrementar os índices reprodutivos obtidos durante a estação de monta. Neste sentido, objetiva-se com o presente estudo avaliar o padrão de perfusão sanguínea de folículos dominantes submetidos à indução da ovulação com hCG por meio da ultrassonografia Collor Doppler, e as concentrações de colesterol e estrógeno em folículos pré-ovulatórios de éguas submetidas ou não ao desconforto térmico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral Equino

A espécie equina é classificada como poliéstrica estacional, tendo o fotoperíodo como fator principal para explicar essa estacionalidade (SHARP, 1980; MOREL, 2003). Fitzgerald e McManus (2000) afirmam que a mudança no fotoperíodo anual é considerada como causa primária para a sincronização da atividade reprodutiva das éguas, após observar que a maioria das éguas encerra a atividade reprodutiva durante o inverno, quando o fotoperíodo é menor. O início da atividade reprodutiva ocorre em associação com o aumento do fotoperíodo, sendo que o aumento abrupto do mesmo, através de iluminação artificial antecipa o início da atividade reprodutiva.

Do ponto de vista reprodutivo, pode-se dividir o ano em quatro fases distintas: O anestro de inverno; fase transicional de primavera; fase ovulatória; transição de outono. Durante o inverno a maioria das éguas entra em anestro sazonal, evento associado à alta concentração de melatonina que suprime a secreção de GnRH, reduzindo conseqüentemente, a produção de LH e FSH. Na primavera, com o incremento da luz do dia, o período de produção de melatonina é encurtado, assim a supressão na secreção do GnRH é cessada com conseqüente incremento na sua freqüência e amplitude, aumentando também a concentração e pulsatilidade de FSH e LH, e conseqüentemente desenvolvimento folicular e aparecimento de sinais comportamentais do cio (ENGLAND, 2005). Sabe-se que outros fatores, como: estado nutricional, idade e temperatura interagem com o efeito do fotoperíodo (DAVID, 2011).

O ciclo ovulatório (estral) da égua tem em média 21 dias de duração, sendo 14-15 dias de diestro, que corresponde à fase luteal e 5-7 dias de estro, correspondente à fase folicular (PALMER e JOUSSET, 1975; GINTHER, 1992; SAMPER, 2008). A duração do ciclo estral em equinos é muito variável de animal para animal, sendo a duração do estro o componente mais importante dessa variação. A ovulação mostra-se mais relacionada ao final do estro do que à sua duração ou início, sendo que essas características tendem a se repetir ano após ano (ROMANO et al., 1998; SAMPER, 2008).

O comportamento de cio é atribuído as altas concentrações sistêmicas de estrógeno associado ao desenvolvimento dos folículos e o diestro é atribuído as altas concentrações sistêmicas de progesterona associado ao desenvolvimento do corpo lúteo. Durante o estro, a concentração da progesterona está abaixo de 1ng/ml (ENGLAND, 2005), já o estrógeno atinge seus valores máximos dois dias antes da ovulação ou três dias antes do pico de LH (GINTHER et al., 2004). Suas concentrações começam a aumentar 1 a 2 dias antes do início da divergência folicular (GASTAL et al., 2000), atingindo o pico dias antes da ovulação, quando o folículo pré-ovulatório mede aproximadamente 35mm (GINTHER et al. 2004).

O estradiol é responsável por aumentar a atividade da enzima aromatase nas células da granulosa, promovendo a expressão de receptores de gonadotrofinas, tornando o folículo mais sensível ao LH (GURGEL et al. 2008). Gastal et al. (1999) relatam em seus estudos a relação do controle do estradiol sobre o FSH, uma vez que a eliminação do folículo mais desenvolvido, resulta em diminuição dos índices de estradiol e inibina e aumento nos níveis de FSH.

Entende-se por esteroidogênese como o processo biológico pelo qual os hormônios esteróides são formados a partir do colesterol e transformados em outros hormônios esteróides (SPEROFF et al. 1995). O processo inicia-se sempre com a conversão do colesterol em pregnenolona, independente do tipo de hormônio esteróide a ser formado. O colesterol, proveniente essencialmente de lipoproteínas plasmáticas, é esterificado e armazenado em gotículas lípidicas citoplasmáticas. Através de estimulação pelo ACTH, uma esterase que reage com o colesterol é ativada e permite a sua passagem para as mitocôndrias. Então o

colesterol é convertido em pregnenolona por hidroxilação seguida de clivagem realizada por uma enzima contendo citocromo P450 (P450_{sc}). A liberação adequada das moléculas hidrofóbicas do colesterol na membrana lipídica mitocondrial interna é uma etapa limitante no processo de regulação da esteroidogênese (KERBAN, 1999; HUNTER, 2004). A proteína responsável pela entrada do colesterol para o lado interno da membrana mitocondrial é a StAR (proteína de regulação aguda da esteroidogênese). Em equinos, esta proteína é composta de 285 aminoácidos e sua seqüência é altamente homóloga a outras espécies.

A pregnenolona irá depois deixar a mitocôndria para originar os seus diferentes produtos finais (SPEROFF et al. 1995). A conversão da pregnenolona em progesterona é dependente de dois passos enzimáticos. A 17 α -hidroxiprogesterona constitui o precursor imediato da série C-19 (19 carbonos) dos andrógenos. Pela formação de peróxido em C-20, seguida pela exposição dos carbonos C-17 e C-20, a cadeia lateral é separada formando-se androstenediona. Ambos os esteróides C-19 (androstenediona e testosterona) são rapidamente convertidos nos esteróides fenólicos C-18 correspondentes (estrona e estradiol) em um processo denominado aromatização. A aromatização de androgênios é responsável pela formação de estrogênios. A androstenediona e a testosterona são produzidas pelas células da teca interna, sendo, depois, convertidas pela enzima aromatase, nas células da granulosa, em estrona e estradiol (sendo o 17 β -estradiol o mais importante), respectivamente (ZACHUT et al. 2008).

2.2 Indução da Ovulação

Vários hormônios podem ser usados para induzir ovulação, como a Gonadotropina Coriônica Humana (hCG), Gonadotropina Equina Bruta (CEG), análogos do Hormônio Liberador de Gonadotropina (GnRH), e mais recentemente, o Hormônio Luteinizante Equino Recombinante (reLH). Contudo, a hCG é o mais comumente utilizado na prática reprodutiva eqüina, por ter eficácia comprovada e tornar o tratamento menos oneroso, quando comparado aos demais (CARLUCCIO et al. 2007; MCCUE et al. 2007; SAMPER, 2008).

A hCG tem atividade bioativa semelhante ao LH, se ligando a seus receptores e proporcionando maturação e ovulação do folículo dominante de éguas em estro, com edema uterino. Ele mimetiza a ação do LH endógeno ao produzir um aumento pré-ovulatório exógeno de LH, sendo eficaz na indução da ovulação em éguas (WILSON et al. 1990; MCCUE et al. 2007; SAMPER, 2008) que geralmente ovulam entre 35,9 \pm 3,2 horas (MCKINNON et al. 1997) e 36,0 \pm 2,1 horas pós-tratamento com hCG (GASTAL et al. 2006). Encontra-se descrito na literatura, a indução eficiente da ovulação com diferentes dosagens de hCG em éguas, com variações entre 750UI e 2500UI por via intravenosa (IV) (MOREL e NEWCOMBE, 2008; ROMANO, 2013). A administração de uma dose de hCG capaz de induzir a ovulação resulta na imediata diminuição das concentrações circulantes de estradiol e num aumento das concentrações circulantes de LH em 24h, semelhante ao que é observado na ovulação espontânea, indicando que o efeito da hCG esteja ligado a mecanismos indiretos entre estradiol/hCG (GINTHER et al., 2009).

Alguns estudos mostram que a administração repetida de hCG, em uma mesma estação de monta, diminui sua eficácia, resultando na não ovulação em 48h (SAMPER, 2008; SERRES et al., 2010), e isto está associado ao desenvolvimento de anticorpos anti-hCG (MCKINNON, 2009). No entanto, estudo realizado por Gastal et al (2006) mostram que mesmo em animais que receberam hCG em três ciclos estrais consecutivos, sua eficácia em induzir a ovulação não foi prejudicada.

Quando da utilização da técnica de OPU “Ovum Pick-Up”, a hCG é comumente utilizada com intuito de acelerar a maturação folicular e melhorar o índice de recuperação de oócitos. Entre 20-36 horas após a aplicação, é realizada a aspiração, e o critério para sua

administração é a presença de folículo dominante (27-35mm), com presença de edema uterino, cervix relaxada e comportamento de cio (VOGELSANG et al., 1988; HINRICHS et al., 1991 e 1998; BRUCK, 1992; SQUIRES e COOK, 1996; CARNEVALE, 2001 e 2005; CARNEVALE e GINTHER, 1995). Em éguas idosas doadoras de oócito, é recomendado o uso de associação entre indutores de ovulação, hCG e deslorelina (GnRH), por favorecerem a maturação folicular e oocitária (CARNEVALE et al., 2005).

2.3 Ultrassonografia Doppler

A Ultrassonografia Doppler começou a ser utilizada em eqüinos no final da década de 90, aumentando a capacidade de diagnóstico, monitoramento e predição de fenômenos na reprodução equina. Possibilitando a reavaliação de conceitos relacionados à fisiologia da reprodução, por produzir, pelas características específicas de fluxo sanguíneo local, uma análise mais precisa da fisiologia de ovários e útero (BOLLWEIN et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2006; GINTHER et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). A ultrassonografia Doppler envolve duas modalidades, a espectral e a referente ao fluxo colorido (CARVALHO et al., 2008). Na técnica Doppler Colorido, o sinal obtido para uma área amostral é codificado por cores em relação ao sentido do movimento e por nuances em relação ao módulo da velocidade do movimento (CERRI e ROCHA, 1993). Os fluxos de maior velocidade são expressos por tonalidades mais claras da mesma cor (CERRI, 1998). A técnica permite avaliar presença, direção e qualidade do fluxo sanguíneo mais rapidamente, assim como a diferenciação entre fluxos rápidos e lentos (SZATMARI et al., 2001).

A vascularização folicular tem relação direta com a composição do fluido folicular e com a tensão de oxigênio, que por sua vez afetam o desenvolvimento oocitário (SUTTON et al., 2003). A vascularização ovariana pode ser avaliada com o auxílio da ultrassonografia Doppler, pela comparação dos eventos de mudança de fluxo sanguíneo com parâmetros morfológicos e endócrinos. Mattioli et al. (2001) sugerem em seus estudos que o fator de crescimento endotelial vascular tem relação direta com o aumento na extensão dos vasos, possibilitando maior fluxo sanguíneo e com a ativação da esteroidogênese, assim, eles relacionaram o diâmetro folicular, concentrações de estrógeno intrafoliculares e a área do fluxo sanguíneo, indicando a possibilidade de associação da ultrassonografia modo B, Doppler colorido e análise hormonal. No momento periovulatório ocorre aumento no fluxo sanguíneo da parede folicular e crescimento do folículo, resultando em aumento significativo da área de vascularização, aumentando o sinal Doppler (ACOSTA et al., 2003) e apenas folículos dominantes com alta vascularização tem chance de alcançar a maturação final e adquirir a capacidade ovulatória (ACOSTA, 2007).

2.4 Estresse Térmico

Uma gama de fatores é utilizada para caracterizar a adaptação fisiológica dos animais ao calor, sendo a frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal e de superfície corporal, assim como evaporação cutânea, as mais utilizadas, embora não exista um consenso (CASTANHEIRA, 2009). Hansen et al (2001) citam alguns efeitos do estresse térmico na reprodução bovina, como: maior dificuldade na detecção do estro por causar uma queda na concentração de estradiol circulante, queda no crescimento e concentração de estradiol no fluido folicular, além de suprimir a habilidade do folículo dominante em exercer a dominância e efeito sobre a competência oocitária.

Em se tratando de ovelhas, experimento realizado por Ozawa et al. (2005) relata que a ovulação tende a atrasar em animais sob estresse térmico, além dos folículos não atingirem o

mesmo tamanho dos observados em animais que não estão em estresse térmico, apresentam atividade de aromatase reduzida, número mais baixo de receptores para LH e menor concentração de estrógeno.

No entanto, no que diz respeito a influência do estresse térmico em éguas, ainda pouco se tem estudado. Estudo recente realizado na Baixada Fluminense aponta para a interferência da umidade e calor sobre a transferência de embriões, onde temperaturas mais altas refletiram em menores taxas de recuperação embrionária assim como de gestação embrionária, e temperaturas mais baixas refletiram em maiores taxas de recuperação embrionária e gestação embrionária (OLIVEIRA et al., 2015).

Estudo realizado por Matsuzuca et al. (2004), os autores investigaram o efeito do estresse térmico em oócitos de camundongos relacionando principalmente ao processo de maturação nuclear. Em embriões, a partir de duas células, sob indução termo-calórica, já se encontram as proteínas do choque-térmico (HSPs), sendo a família da HSP70 atuante de forma a proteger o embrião estabilizando suas estruturas protéicas e RNA ribossomal, além de impedir apoptoses, mas muitas vezes, aparece em quantidades insuficientes para evitar maiores danos as estruturas celulares (EDWARDS e HANSEN, 1996).

A função sexual pode ser influenciada pelos hormônios relacionados ao estresse em três níveis do eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal: no hipotálamo, por meio do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), onde este inibe a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, por conseqüência, diminui a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) na hipófise anterior, alterando nas gônadas o efeito estimulatório das gonadotrofinas (PEREIRA, 2005) prejudicando a reprodução animal. Com a diminuição da liberação das gonadotrofinas (LH e FSH), a produção de estrógenos também será afetada, o que irá acarretar em diversos transtornos reprodutivos como: falhas na detecção do estro ocasionadas pela presença de estro silencioso, falhas no desenvolvimento e na qualidade do oócito, na fertilização e na implantação, formação de corpo lúteo de má qualidade, condição de anestro ou ninfomania (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003; GRUNERT et al., 2005). É observada reduzida expressão de estro e mortalidade embrionária precoce como reflexos das alterações nas funções do fluido folicular durante estresse térmico, principalmente no que diz respeito à dinâmica folicular e atividade ovariana (OZAWA et al., 2002).

Acréscimos na temperatura corporal causados por estresse térmico têm efeito direto e com conseqüências adversas na função celular comprometendo a sua qualidade com conseqüente redução na taxa de fertilização (HANSEN, 2001; SARTORI et al., 2002). Isto está possivelmente relacionado ao fato de prejudicar a capacidade esteroidogênica dos folículos e da dinâmica folicular ovariana, afetando folículos no início do estágio antral do desenvolvimento e causando prejuízo no folículo subseqüente, na função e na redução da dominância do folículo selecionado (GUZELOGLU et al., 2001; OZAWA et al., 2005). Tal fato pode ser observado por uma redução da capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa, a qual altera a expressão do RNAm de receptores de colesterol e LH com redução significativa na atividade da aromatase e, conseqüentemente, nas concentrações de estradiol em células ovarianas, bem como as concentrações de colesterol total e ácidos graxos no fluido folicular ovariano de folículos de vários tamanhos (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003; SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010; ARGOV et al., 2005; OZAWA et al., 2005). Isso leva a uma menor competência do oócito e também comprometimento dos mecanismos luteolíticos que são dependentes do estrógeno. Estes resultados mostram que o estresse térmico durante o recrutamento folicular reduz a atividade em folículos por meio do decréscimo das concentrações de estradiol e da atividade enzimática da aromatase (AL KATANANI et al., 2002; BRIDGES et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IV/UFRRJ), sob o protocolo de número 022/2015 e aprovado em 25 de abril de 2015.

3.1 Local, Período do Experimento, Animais e Manejo

O presente experimento foi conduzido nos meses de março e abril de 2014 no Setor de Reprodução Animal (SFRIA) pertencente ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) do Instituto de Zootecnia da UFRRJ em Seropédica, RJ. Para tanto, foram utilizando 15 ciclos estrais de éguas da raça Mangalarga Marchador, oriundas do Setor de Matrizes (Instituto de Zootecnia da UFRRJ), as quais tiveram seu trato reprodutivo previamente avaliado por ultrassonografia para certificação de que estivessem ciclando normalmente. Em seguida foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: um grupo no qual as éguas ficaram em piquete sombreado (Grupo I; n=7) e o outro grupo em piquete com restrição de sombra (Grupo II; n=8). Todos os animais ficaram nos piquetes entre as sete horas da manhã e seis horas da tarde, recebendo durante o dia 2 % do peso vivo de matéria seca por animal, dois quilogramas de ração comercial por animal, sal mineral e água a vontade. Durante a noite, os animais ficavam soltos em piquete aberto, dispondo de capim e água à vontade.

3.2 Ultrassonografia Doppler e Aspiração Folicular

Os animais passaram por adaptação prévia de quatro meses (de novembro de 2013 a fevereiro de 2014) e informações relativas ao ciclo estral de cada égua durante os meses de março e abril (período de experimento) foram coletados. Durante o período de experimento, os ciclos estrais das éguas foram acompanhados periodicamente. No quinto dia após ovulação (D5) as éguas receberam 5 mg de Lutalyse®. (Dinoprost Trometamina – PGF2 alfa), IM, e partir de então tiveram seu trato reprodutivo avaliado por meio de ultrassonografia transretal modo B, transdutor linear de 5 MHz, periodicamente, a cada dois ou três dias. No momento em que o maior folículo atingiu diâmetro igual ou maior que 32 mm, a égua recebeu uma dose de 1000 UI de Chorulon® (hCG),IV, e passou a ser monitorada por ultrassonografia modo Doppler de 6 em 6 horas por 24 horas, momento em que o folículo pré-ovulatório foi aspirado segundo metodologia descrita por Carnevale (2004). A perfusão vascular folicular foi estimada de maneira subjetiva levando-se em consideração o percentual da circunferência da parede folicular com sinais Doppler coloridos (Figura 1).

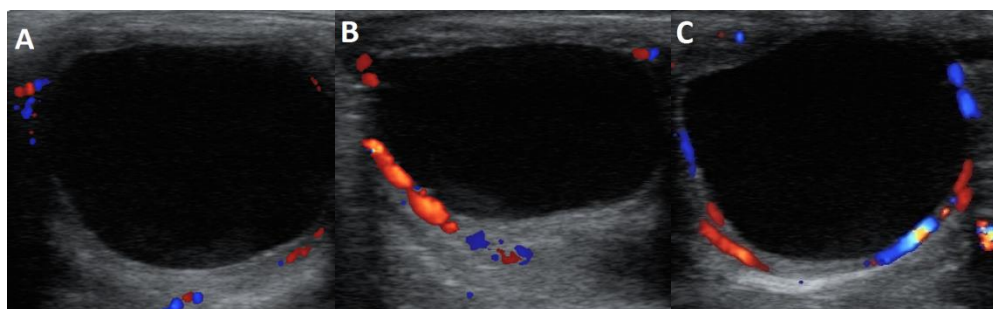


Figura 1: Exame ultrassonográfico modo color Doppler de folículos pré-ovulatórios de éguas Mangalarga Marchador. Representação de perfusão vascular folicular subjetiva, de 0 a 100%, onde: A=15%, B=30%, C=50% (Arquivo pessoal).

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

O fluido folicular aspirado foi recuperado em frascos tipo Erlenmeyer, sendo posteriormente colocado em tubo Falcon de 50 ml e centrifugado a 1000 G por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante recuperado foi armazenado em criotubos a -20 °C até que a dosagem de estrógeno e colesterol fosse realizada.

3.3 Dosagem Hormonal

A dosagem de colesterol no fluido folicular foi realizada por espectrofotometria utilizando o “kit” Cholesterol, BioSystems (REF 11506). E a mesma foi realizada no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da UFRRJ. A dosagem de estrógeno no fluido folicular foi realizada por radioimunoensaio (RIA) utilizando o “kit” Ultra-Sensitive Estradiol, Beckman Coulter (REF DSL4800), em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense (UFF), sendo necessária uma diluição de 4.444 vezes das amostras.

3.4 Avaliação Bioclimática

A resposta dos animais aos diferentes ambientes foi acompanhada pela mensuração da temperatura retal (TR), da frequência cardíaca (FC) e da respiratória (FR). A temperatura retal foi medida em graus Celsius (°C), introduzindo-se o termômetro de mercúrio pelo ânus e o mantendo em contato com a mucosa retal por um minuto. Já a frequência cardíaca foi aferida com utilização de estetoscópio manual (batimentos por minuto) e frequência respiratória por meio de contagem dos movimentos respiratórios observados no flanco por um minuto (movimentos por minuto). Esses dados foram obtidos em dias de sol com pouca nebulosidade, pelo menos uma vez por semana, até o dia da aspiração folicular do folículo pré-ovulatório.

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

$$ITU = 0,8 Tbs + UR (Tbs - 14,3)/100 + 46,3$$

Onde:

Tbs = temperatura do bulbo seco (°C);

UR = umidade relativa do ar (%).

A avaliação da adaptabilidade dos animais ao ambiente foi obtida com a utilização dos seguintes testes: Teste de Ibéria adaptado por Muller (1982), no qual a temperatura retal foi obtida em dias ensolarados, nos horários de 07, 13 e 17 horas, com mensurações em dias

alternados por ciclo estral. Coeficiente de Tolerância ao Calor (CTC) do teste de Ibéria foi adaptado de Amakiri e Funcho (1979). Nesse teste o valor mais próximo de 100 implica em animais mais adaptados ao ambiente.

$$CTC = 100 - [18 (TR_{13} - TR_7)]$$

Onde:

CTC = coeficiente de tolerância ao calor;

100 = eficiência máxima em manter a temperatura corporal em 38°C;

18 = constante;

TR₁₃ = temperatura retal às 13 horas;

TR₇ = temperatura retal às 07 horas.

O Coeficiente de Adaptabilidade (CA) foi estimado, a partir da fórmula de Benezra adaptado por Martins Jr. (2004):

$$CA = TR/38 + FR/16 + FC/34$$

Onde:

CA = Coeficiente de Adaptabilidade;

TR = Temperatura retal às 13 horas;

FR = Frequência respiratória, em movimentos por minuto às 13 horas;

FC = Frequência cardíaca, em batimentos por minuto às 13 horas;

38 = Temperatura retal média normal de equino;

16 = Frequência respiratória média normal de equinos;

34 = Frequência cardíaca média para equinos.

O valor do índice obtido foi comparado a três que é observado quando os parâmetros fisiológicos não se alteram em relação ao aceito como normal, sendo considerados mais adaptados ao calor os animais com menor desvio desse valor.

As variáveis climáticas e os testes bioclimáticos, bem como as variáveis fisiológicas foram mensurados de modo a obter subsídios para interpretação da influência das diferentes condições climáticas sobre a vascularização do folículo pré-ovulatório após indução com hCG e níveis de colesterol e estrógeno do fluido folicular de éguas.

3.5 Análise Estatística

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Índice de Temperatura e Umidade médio obtido para o período do experimento foi de 59,28, sendo que para o mês de março foi obtido ITU de 60,24 e para o mês de abril ITU de 58,33. De acordo com Hahn (1985) um valor de ITU de 70 ou menor mostra uma condição

normal; valores entre 71 e 78 indicam uma condição crítica; entre 79 e 83 existe um perigo e acima de 83 uma condição de emergência está presente. Portanto, os ITUs de março e abril estão dentro da faixa compreendida como confortável para os animais, no entanto, para o cálculo desse índice, considera-se a temperatura e umidade médias do dia e não os momentos nos quais as mensurações de frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal foram realizadas. Outro ponto a ser considerado refere-se ao fato do experimento ter sido realizado nos meses de março e abril, fim de verão (até 20 de março) e outono (20 de março a 31 de abril), quando a média de temperatura diária já se encontra mais amena. E ainda, segundo Rammerstorfer *et al.* (2001), apenas essas informações de temperatura e umidade não seriam suficientes para quantificar o grau do estresse a que estariam submetidos nesse ambiente, pois, além de informações climáticas, parâmetros inerentes ao animal também devem ser considerados. O resultado médio obtido após análise dos dados referentes ao Coeficiente de Tolerância ao Calor (Tabela 1) foi de 95,47 para o Grupo I (Sombreado) e 87,14 para o Grupo II (Restrição de sombra).

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

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

CTC = Coeficiente de Tolerância ao Calor.

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

Foi observada diferença (p<0,05) entre os grupos, demonstrando uma maior capacidade das éguas do Grupo I (Sombreado) em relação às do Grupo II (Restrição de sombra) em manter a temperatura retal constante, uma vez que para o cálculo deste índice, foi levada em consideração a temperatura retal das 07 e das 13 horas. A temperatura retal média encontrada às 7 e 13 horas no Grupo I foi de 37,5°C e 37,8°C, respectivamente. Já para o Grupo II, as médias foram de 37,4°C e 38,2°C, respectivamente, às 7 e 13 horas. Essas médias não diferiram entre os grupos. Os animais se mostraram capazes de manter a temperatura abaixo de 38°C, que é a temperatura considerada normal para equinos (ESMAY, 1979), respeitando uma variação normal que existe nos homeotérmicos de 0,5°C para mais ou para menos. Anderson (1977) comenta que, em animais que são normalmente ativos durante o dia, há uma variação normal da temperatura corporal que é mínima, pela manhã, e máxima, no período da tarde, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Em se tratando do Coeficiente de Adaptabilidade, os resultados médios obtidos estão apresentados a seguir (Tabela 2).

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

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

CA = Coeficiente de Adaptabilidade.

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

Foi observada diferença (p<0,05) entre os grupos, demonstrando uma maior adaptabilidade do Grupo I em relação ao Grupo II, já que, para esse teste, resultados mais

próximos de três indicam animais mais adaptados ao ambiente. Este índice leva em consideração a temperatura retal e a frequência respiratória e cardíaca dos animais. Ao observarmos as médias desses parâmetros obtidas para os diferentes grupos, constatou-se que a frequência respiratória foi o parâmetro que mais se distanciou do que é considerado fisiológico, tanto para o Grupo I quanto para o Grupo II, sendo este distanciamento mais acentuado no Grupo II. Esse resultado é explicado por Paludo et al. (2002), que justificaram ser essa característica a primeira linha de defesa fisiológica do animal, quando submetido ao estresse térmico, denotando assim ser passível de maior variação. A alteração na frequência respiratória parece ser o mecanismo termorregulatório mais facilmente usado pelos equinos em ambiente quente (OLIVEIRA et al., 2008). Adicionalmente, a média de temperatura retal manteve-se dentro do parâmetro considerado normal nos dois grupos, o que indica adaptabilidade dos animais, uma vez que estes usam do aumento na frequência respiratória e frequência cardíaca para manterem a temperatura corporal o mais próximo possível do normal (OLIVEIRA et al., 2008). Desta forma, fica evidente que os animais do Grupo II sofreram desconforto térmico, mas não estresse térmico, e que usaram da respiração e dos batimentos cardíacos, os recursos para a manutenção da temperatura corporal, sendo assim, considerados adaptados. Tal adaptação provavelmente fez com que não tivessem prejuízos na fisiologia reprodutiva, uma vez que o acréscimo na temperatura corporal em decorrência do estresse térmico é capaz de comprometer taxa de fertilização oocitária (HANSEN, 2001; SARTORI et al., 2002), pois prejudica a capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003).

A concentração média de colesterol dosado no fluido folicular das éguas do Grupo I (Sombreado) foi de 51,625 mg/dL, e a média dosada para o Grupo II (Restrição de sombra) foi de 46,142 mg/dL (Tabela 3). A concentração média de estrógeno no fluido folicular no Grupo I (Sombreado) foi de 325,73ng/ml, enquanto a dosagem média encontrada para o Grupo II (Restrição de sombra) foi de 316,38ng/ml (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) entre a média dos dois grupos, tanto no que se refere a concentração de colesterol, quanto no que se refere a concentração de estrógeno no fluido folicular.

Tabela 3: Níveis médios e erro padrão de colesterol e estrógeno para Grupo I (Sombreado) e Grupo II (Restrição de sombra).

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

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

Caso fosse constatado que animais não se adaptaram e encontrássemos os mesmos resultados, estes poderiam ser explicados pelo fato de termos induzido a ovulação dos animais com hCG, uma vez que o tratamento com hCG causa, em folículos pré-ovulatórios, a indução da expressão gênica do RNAm desta proteína nas células da granulosa (KERBAN, 1999).

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

Na tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação subjetiva da perfusão vascular folicular (PVF) após a indução com hCG, nas diferentes horas em que os folículos pré-ovulatórios foram avaliados (da indução até o momento da aspiração folicular). No momento da indução da ovulação com hCG (H0), as éguas do Grupo I apresentaram média de PVF superior as éguas do Grupo II. Seis horas após a indução (H6) houve um aumento na PVF, sendo esse aumento mais acentuado nas éguas do Grupo I. Doze horas após a indução (H12), as éguas do Grupo I apresentaram uma redução na perfusão vascular enquanto as éguas do Grupo II mantiveram aumento na PVF média, em relação ao momento H12. Em H18, os dois grupos apresentaram taxa de PVF menor quando comparado ao momento anterior e no momento seguinte, H24, momento da aspiração folicular, ambos os grupos apresentavam PVF maior quando comparados ao momento anterior.

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

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

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

Em nenhum dos momentos avaliados houve diferença estatística significativa entre a taxa de PVF média dos dois grupos. Assim como para os níveis de estrógeno e de colesterol no fluido folicular das éguas dos dois grupos, após a análise bioclimática, não eram esperadas que fossem encontradas diferenças significativas na porcentagem de perfusão vascular entre os grupos, uma vez que o estresse térmico não foi causado. Além disso, no que se refere à irrigação dos folículos pré-ovulatórios avaliados por ultrassonografia Collor Doppler, foi sugerido que as concentrações plasmáticas mais baixas de LH durante a transição de primavera levam à menor perfusão vascular folicular e subsequente atresia folicular (ACOSTA et al., 2004). Por ter sido utilizado o hCG nos dois grupos, pode explicar a não diferença estatística significativa encontrada entre a média dos dois grupos em nenhum dos cinco momentos em que o folículo pré-ovulatório foi avaliado. Em casos de ovulação espontânea, Gastal et al (2006) encontraram um aumento progressivo na perfusão vascular do folículo pré-ovulatório, atingindo valores máximos, entre 80 e 90% de pontos coloridos Doppler presentes na parede folicular, durante 36 e 12 horas prévias à ovulação, seguido por

uma diminuição brusca nas últimas quatro horas. No presente estudo, perfusões vasculares foliculares com esses índices não foram encontradas, sendo que essa diferença pode ter ocorrido em função das diferentes metodologias utilizadas nos experimentos (ovulação induzida versus ovulação espontânea).

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e nas condições em que o mesmo foi realizado, pode-se concluir que: 1) As condições ambientes não foram capazes de causar estresse térmico nos animais; 2) Os animais do Grupo II (Restrição de sombra) sofreram desconforto térmico, mas se mostraram adaptados quando foram capazes de manter a temperatura retal dentro dos parâmetros de normalidade; 3) O desconforto térmico não foi capaz de alterar a perfusão vascular dos folículos pré-ovulatórios; 4) As concentrações de estrógeno e de colesterol no fluido folicular não sofreram alteração nas éguas mantidas em condições de desconforto térmico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759-767, 2003.
- ACOSTA, T.J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 39-44, 2007.
- ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 637-642, 2004.
- 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. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 390-396, 2002.
- AMAKIRI, S.F.; FUNCHO, O.N. Studies of rectal temperature, respiratory rates and heat tolerance in cattle in the humid tropics. **Animal Production**, v. 28, p. 329-335, 1979.
- ANDERSON, B. E. Temperatura regulation and environmental physiology. In: **Dukes' physiology of domestic animals**. 9. ed. Ithaca: Cornell Univ. Press, p. 686-695, 1977.
- ARGOV, N.; MOALLEM, U.; SKLAN, D. Summer heat stress alters the mRNA expression of selective-uptake and endocytotic receptors in bovine ovarian cells. **Theriogenology**, v. 64, p. 1475-1489, 2005.
- BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 65, p. 2043-2051, 2002.
- BRIDGES, P.J.; BRUSIE, M.A.; FORTUNE, J.E.E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 508-522, 2005.
- BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p. 58-59, 1992.
- CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; TOSIA, U.; FAUSTINI, M.; AMICISA, I. De; VERONESI, M.C. Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. **Theriogenology**, v. 68, p. 14-919, 2007.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 209-214, 1995.
- CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; MACLELLAN, L.J.; ALVARENGA, M.A.; THOMAS, J.S. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 87-91, 2001.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gameta intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 617-624, 2004.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program from subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519-527, 2005.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Morfologia duplex Doppler dos principais vasos sanguíneos abdominais em pequenos animais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 880-888, 2008.

CASTANHEIRA, M. Análise multivariada de características que Influenciam a tolerância ao calor em equinos, ovinos e bovinos. **Dissertação**. Universidade Federal de Goiás, 2009.

CERRI, G.G. Avaliação dúplex do fígado, sistema portal e vasos viscerais. In **Doppler**. São Paulo: Sarvier, cap.6, p. 120-121, 1998.

CERRI, G.G.; ROCHA, D.C. **Ultra-sonografia abdominal**. São Paulo: Sarvier, 459 p, 1993.

DAVID, F.F.A. Fotoperíodo artificial no verão pode evitar anestro estacional na égua? **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 340-346, 1996.

ENGLAND, G.C.W. **Fertility and obstetrics in the horse**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing, 2005.

KERBAN, A.; BOERBOOM, D.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 140, p. 667-674, 1999.

ESMAY, M.L. **Principles of animal environment**. AVI: Publishing Co Inc. 2nd ed, p. 358, 1983.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 105-111, 2011.

FITZGERALD, B.P.; McMANUS, C.J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 335-340, 2000.

FUCK, E.J.; MORAES, G.V.; SANTOS, G.T. Fatores nutricionais na reprodução das vacas leiteiras. I. Energia e proteína. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, p. 147-161, 2000.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 53, p. 925-940, 2000.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; GINTHER, O.J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour Doppler signal in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction Research**, v. 131, p. 699-709, 2006.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; WILTBANK, M.; GINTHER, O.J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentration in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 31-39, 1999.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of mare: basic and applied aspects**, 2ed, Wisconsin: Equiservices Publishing, p.642, 1992.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BERGFELT, D.R.; BAERWALD, A.R.; PIERSON, R.A. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and woman. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1195-1201, 2004.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E., GASTAL, M.; UTT, M.D.; BEG, M. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 213-220, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPER, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 311-317, 2009.

GRUNERT E.; BIRGEL E.H.; VALE G.W. **Patologia clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. São Paulo: Varela, p. 551, 2005.

GURGEL, J. R.C., VIANA, C.H.C., PEREZ, E.G.A., NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 122-132, 2008.

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

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

HAHN, G. L. Management and housing of farm animals in hot environments. In: YOUSEF, M.K. **Stress Physiology in Livestock**. Vol. II. Ungulates. Boca Raton: CRC Press, Inc., p. 151-174, 1985.

HANSEN P.J.; DROST M.; RIVERA M.R.; PAULA-LOPES F.F.; AL-KATANANI M.Y.; KRININGER E.C.; CHASE C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.

HANSEN, J.P. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. **Proceedings of the 7 th Western Dairy Management Conference**. v. 1, p. 9- 11, 2005.

HINRICHS, K.; MATTHEWS, G.L.; FREEMAN, D.A.; TORELLO. E.M. Oocyte transfer in mares. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 212, p. 982-986, 1998.

HINRICHS, K.; RAND, W.M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 292-298, 1991.

HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 461-477, 2004.

MARTINS JÚNIOR, L.M. Adaptabilidade das raças Boer e Anglonubiana às condições climáticas da região Meio Norte do Brasil. 2004. 44 f.. **Dissertação**. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2004.

MATSUZUKA, T.; OZAWA, M.; HIRABAYASHI, M.; USHITANI, A.; KANAI, Y. Developmental competence and glutathione content of maternally heat stressed mouse oocytes and zygotes. **Animal Science Journal**, v. 75, p. 117-24, 2004.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P.A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1014-1019, 2001.

McCUE, P.M.; MAGEE, C.; GEE, E.K. Comparison of Compounded Deslorelin and hCG for Induction of Ovulation in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 58-61, 2007.

McKINNON, A.O.; PERRIAM, W.J.; LESCUN, T.B.; WALKER, J., VASEY, J.R. Effect of a GnRH analogue (Ovuplant), hCG and dexamethasone on time to ovulation in cycling mares. **World Equine Veterinary**, v. 2, p. 16-18, 1997.

McKINNON, A.O. Hormonal Control of Equine Reproduction. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP Annual Resort Symposium**, p. 139-186, 2009.

MIYAMOTO, A; SHIRASUNA, K; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 153-160, 2006.

MOREL, M.D. Endocrine Control of Reproduction in the Mare, Equine Reproductive Physiology, **Breeding and Stud Management III**, 2nd Ed, Cabi Publishing, p. 28-39, 2003.

MOREL, C.G.D; NEWCOMBE, J.R. The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 189-199, 2008.

MÜLLER, P.B. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. 3ª ed. Sulina, p. 262, 1982.

OLIVEIRA, A.L.; CAMPEL, J.E.G.; AZEVEDO, D.M.M.R.; COSTA, A.P.R.; TURCO, S.H.N.; MOURA, J.W.S. Estudo de respostas fisiológicas de equinos sem raça definida e da raça Quarto de Milha às condições climáticas de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 827-838, 2008.

OLIVEIRA, J.P.; JACOB, J.C.F.; JESUS, V.L.T.; SILVA, P.C.A. Influência da temperatura e umidade ambiente em um programa de transferência de embriões equinos, na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 37:2, p. 158-162, 2015.

OZAWA M.; HIRABAYASHI M.; KANAI Y. Developmental competence and oxidative state of murine zygotes heat stressed maternally or in vitro. **Reproduction**, v. 124, p. 683-689, 2002.

OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, L.A.; SHIMIZU, T.; OSHIMA, I.; KANAI, Y. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v. 129, p. 621- 630, 2005.

PALMER, E.; JOUSSET, B. Urinary oestrogen and plasma progesterone levels in non-pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 213-221, 1975.

PALUDO, G.R.; MCMANUS, C.; MELO, R.Q.; CARDOSO, A.G.; MELLO, F.P.S.; MOREIRA, M.; FUCK, B.H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do Exército Brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1130-1142, 2002.

PEREIRA, C. C. J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal**. FEPMVZ, p. 195, 2005.

RAMMERSTORFER, C.; POTTER, G.D.; BRUMBAUGH, G.W.; GIBBS, P.G.; VARNER, D.D.; RAMMERSTORFER, E.H. Physiologic responses of acclimatized or non-acclimatized mature reining horses to heat stress. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, p. 431-438, 2001.

RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, J. R. Heat Stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, v. 6, p. 1139-1151, 2003.

RODRIGUES, P.G.; RAYMUNDO, C.M.; SOUZA, J.C.; MIRANDA, M.C.M.G.; REZENDE, A.S.C. Gordura corporal e eficiência reprodutiva em éguas doadoras de embrião Mangalarga Marchador. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 5, p. 1002-1008, 2011.

ROMANO, M. A. Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento da ovulação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 25-28, 1998.

ROMANO, R. M. Influência da gonadotrofina coriônica humana sobre a hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e desenvolvimento luteal em éguas. 102f. **Dissertação** (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

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

SAMPER, J.C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not? **Theriogenology**, v. 70, p. 445-447, 2008.

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

SERRES, C.; GÓMEZ-CUÉTARA, C.; GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; REDONDO, M. Effect of hCG administration at different times of the day on the interval to ovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 74-75, 2010.

SHARP, D.C. Environmental influences on reproduction in horses. **Veterinary Clinics of North America**, v. 2, p. 207-233, 1980.

SHEHAB-EL-DEEN M.; FADEL M.S.; SOOM A.V.; SALEH S.Y.; MÃES D.; LEROY J.L.M.R. Circadian rhythm of metabolic changes associated with summer heat stress in high-producing dairy cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1119-1125, 2010.

SPEROFF, L.; GLASS, R.H.; KASE, N.G. **Endocrinologia ginecológica**, Clínica e Infertilidade. 5^o edição, p. 1068, 1995.

SQUIRES, E.L.; COOK, N.L. Transvaginal aspiration. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 13-29, 1996.

SUTTON-MCDOWALL, M.E.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 35-48, 2003.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 42, p. 93-107, 2001.

VOGELSANG, M.M.; KREIDER, J.L.; BOWEN, M.J.; POTTER, G.D.; FORREST, D.W.; KRAEMER, D.C. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v. 29, p. 1007-1018, 1988.

WILSON, C.G.; DOWNIE, C.R.; HUGHES, J.P.; ROSER, J.F. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 10, p. 301-308, 1990.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; ARGOV, N.; MOALLEN, U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, v. 135, p. 683-692, 2008.