

Sazonalidade na dinâmica folicular ovariana e produção embrionária em novilhas da raça Guzerá

Reubes Valério da GAMA FILHO¹
Francisco Aloizio FONSECA¹
Vanessa Gomes UENO²
Reginaldo da Silva FONTES²
Célia Raquel QUIRINO²
José Leonardo Gualberto RAMOS¹

1 - Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ
2 - Laboratório de Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ

Correspondência para:

Reubes Valério da Gama Filho
Rua Padre Ângelo Pessanha, 118- Bl 1- Apt.
402 Turf Club- Campos dos Goytacazes, RJ
Cep: 28.013.080
e-mail: reubesgama@bol.com.br

Recebido para publicação: 15/08/2005
Aprovado para publicação: 23/08/2007

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da sazonalidade sobre a dinâmica folicular ovariana e analisar a influência de temperaturas elevadas no desenvolvimento embrionário inicial em novilhas da raça Guzerá. Seis animais foram sincronizados e o dia do estro foi considerado D0. A dinâmica folicular foi acompanhada por dois ciclos estrais consecutivos, na época 1 (verão) e 2 (inverno), utilizando-se um ultrassom Scanner 200 Vet (Pie Medical). Após nove dias do término do segundo ciclo estral, todos os animais iniciaram o tratamento superovulatório, com duração de quatro dias. Os animais foram inseminados artificialmente, 12 e 24 horas após a detecção do estro. A coleta dos embriões foi realizada sete dias após a primeira inseminação. Houve efeito sazonal no número de ondas foliculares, com maior prevalência de ciclos com uma onda no verão. O intervalo estral e ovulatório apresentaram maior duração no verão. Foi encontrado efeito significativo de época sobre a duração do crescimento do folículo ovulatório, ocorrendo maior persistência no verão. A taxa de crescimento folicular foi menor no verão. A temperatura retal oscilou entre as épocas, evidenciando a influência ($P < 0,05$) da estação do ano sobre a temperatura corporal interna. O THI (índice de temperatura e umidade) observado no verão foi 94 e no inverno 86, sugerindo a condição de estresse dos animais. O número de estruturas viáveis foi maior na época 2, sugerindo os efeitos de época sobre a fertilização dos oócitos. As concentrações de progesterona não apresentaram efeito de época. As alterações na dinâmica folicular em decorrência do estresse térmico, tais como, taxa de crescimento folicular diminuída e aumento na duração do crescimento folicular, podem comprometer a qualidade do oócito e afetar a subsequente funcionalidade do corpo lúteo.

Palavras-chave:

Dinâmica folicular.
Estresse térmico.
Gado Guzerá.
Embriões. Superovulação.

Introdução

As características climáticas na maioria das regiões brasileiras favorecem os animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) devido a sua maior adaptabilidade ao clima tropical, entretanto, poucos estudos demonstram a maior tolerância do gado zebuino ao estresse térmico, com informações limitadas sobre a influência do mesmo na eficiência reprodutiva.

Em condições ótimas de criação, é notória a superioridade produtiva e

reprodutiva dos animais de origem européia, quando comparados aos zebuínos.¹ Entretanto, vacas *Bos taurus taurus* são muito susceptíveis ao estresse térmico, apresentando reduções bruscas na lactação. Algumas características como o longo intervalo entre partos e a curta duração do estro, associados à elevada percentagem de animais que manifestam estro no período noturno, justificam em parte as menores taxas reprodutivas encontradas nos zebuínos.²

Os resultados em diversos sistemas de produção de embriões, geralmente, não

apresentam repetibilidade. Dentre as principais justificativas para esta dificuldade na padronização da resposta das doadoras, pode-se ressaltar as variações térmicas ambientais, onde poucos estudos demonstram a sensibilidade ou tolerância do gado zebuino a sazonalidade.

Especial atenção têm sido dedicada ao conhecimento detalhado sobre a dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral bovino, objetivando a melhoria dos índices reprodutivos por meio do controle da ação farmacológica sobre os folículos ovarianos e o corpo lúteo.³

Com a utilização do diagnóstico por imagem (ultra-sonografia) é possível mensurar o crescimento e a regressão estrutural dos folículos ovarianos e do corpo lúteo. Adicionalmente, com a análise das concentrações séricas de progesterona, avalia-se a funcionalidade do corpo lúteo. Possivelmente, condições ambientais adversas, podem comprometer a funcionalidade do corpo lúteo e a competência do oócito, reduzindo a taxa de fertilização.⁴

Estudos ultra-sonográficos sugerem o declínio da função folicular em vacas expostas a temperaturas elevadas durante a primeira onda folicular, ou quando a luteólise é induzida por PGF 2a.^{5,6}

Atualmente, as informações disponíveis sobre a fisiologia reprodutiva dos animais zebuínos são conflitantes, evidenciando a importância de um estudo mais elucidativo, sobretudo, no que tange à raça *Guzerá*, cuja posição de destaque na pecuária brasileira consolidou-se nos últimos anos, na medida em que a referida raça possui dupla aptidão (leite e corte) e apresenta grande rusticidade.

Desta forma, é impreterível e urgente a caracterização da fisiologia reprodutiva dos animais zebuínos, em especial da raça *Guzerá*, objetivando como resultado final à exploração ótima do potencial genético de animais selecionados.

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos do estresse térmico sobre a dinâmica folicular ovariana e as

concentrações séricas de progesterona durante o ciclo estral e verificar as possíveis influências do estresse térmico no desenvolvimento embrionário inicial em novilhas da raça *Guzerá*.

Material e Método

Foram utilizadas seis novilhas da raça *Guzerá* com cerca de 25 meses de idade, com bom escore corporal, peso vivo acima de 300 kg, e atividade cíclica regular. Os animais foram mantidos em regime semi-intensivo, onde a dieta fornecida supriu as exigências nutricionais dos animais, que receberam sal mineral proteinado e água “ad libitum”.

Os animais tiveram o estro sincronizado por meio de duas aplicações intramusculares de PGF2a (500 microgramas de Cloprostenol-Giosinã, COOPERS) com intervalo de 11 dias.

O dia do estro foi considerado o D0, onde foi iniciada a avaliação ultra-sonográfica (Scanner 200 Vet,-Pie Medical, acoplado a um transdutor transretal linear de 5,0 Mhz) diária, sendo encerrada um dia após a ovulação no segundo ciclo estral de cada animal. O diâmetro dos folículos e dos corpos lúteos foram registrados em mapas. A temperatura retal e ambiente, bem como a umidade relativa (UR%) foram mensurados diariamente.

O tratamento superovulatório iniciou-se nove dias após o término do segundo ciclo estral e se estendeu por quatro dias, com a aplicação de FSH (Folltropin-V[®], em doses decrescentes: 35-35, 30-30, 20-20 e 15-15 mg NIH) a cada doze horas por via IM, totalizando 200 mg NIH de FSH por animal. Concomitantemente com a sexta dose de FSH (11^o dia de tratamento) foram aplicados 0,5 mg de Cloprostenol, via intramuscular, objetivando a lise do corpo lúteo remanescente. Após um prazo de 24h da aplicação de PGF2a as novilhas foram monitoradas até a manifestação do estro, identificado pela primeira aceitação de monta.

Todas as novilhas foram inseminadas artificialmente respeitando os intervalos de

12 e 24 h após detecção do estro, utilizando-se sêmen de qualidade comprovada, de um único touro e de mesma partida (minimizar os efeitos do sêmen na fertilidade), sendo descongelado a 37 °C por 30 segundos.

A coleta das estruturas foi realizada pelo método não cirúrgico, sete dias após a primeira inseminação artificial. Os cornos uterinos foram lavados simultaneamente com 1.000 ml de solução comercial PBS modificado (Dulbecco Modificado) aquecido a 37 °C, com 1 % de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina G - 100 UI/ml e sulfato de estreptomicina - 100 ml / ml).

A classificação das estruturas coletadas foi realizada quanto ao estágio de desenvolvimento⁷ em: oócito, mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido e qualidade em: categoria 1 (excelente e bom), categoria 2 (regular), categoria 3 (pobre) e categoria 4 (não fecundado ou degenerado), segundo as normas da IETS.⁸

As amostras sanguíneas foram coletadas da veia jugular em dias alternados, a partir do dia do estro até a ovulação, em tubos vacutainer heparinizados e centrifugadas à 2500 rpm por 25 min. para obtenção do plasma. As concentrações de progesterona foram obtidas por RIA (radioimunoensaio), com a utilização de “kits” comerciais (Coat-A-Count, DPC, Los Angeles, CA).

A análise estatística dos dados da dinâmica folicular ovariana em relação ao estresse calórico foi realizada por análise de variância, utilizando-se modelos lineares, de acordo com os procedimentos do SAS⁹, a avaliação das concentrações de progesterona foi realizada pelo método de regressão e a estatística descritiva revelou o comportamento dos embriões nas duas épocas experimentais.

Resultados e Discussão

Foram acompanhados 24 ciclos estrais e a dinâmica folicular caracterizou-se por uma (46 %) ou duas (54 %) ondas de

crescimento folicular, com maior prevalência de ciclos com uma onda na E1 (verão) e duas ondas na E2 (inverno). A ocorrência de duas ondas foliculares encontrada neste experimento é similar às observações relatadas para taurinos e zebuínos.^{10,11} Entretanto, o padrão de uma onda de crescimento folicular, observado no verão, contrasta com os achados de Sirois e Fortune¹². Não ocorreu aumento na duração da fase luteal na E1, divergindo dos achados de Wilson et al.¹³, que observaram o prolongamento da vida do corpo lúteo em condições de estresse térmico. As causas destas variações não estão totalmente elucidadas, mas sabe-se que há influência sazonal⁵, fisiológica e nutricional¹⁴.

As temperaturas mais elevadas encontradas no verão (E1) podem ter influenciado o intervalo estral e o intervalo ovulatório, prolongando a duração destas características quando comparadas à E2 ($23,67 \pm 3,44$ vs $18,50 \pm 3,76$ e $23,95 \pm 2,66$ vs $19,33 \pm 2,94$ dias, respectivamente - $P > 0,05$), o que pode estar relacionado com o prolongamento da fase folicular. Esses resultados são semelhantes aos achados de Wilson et al.¹⁵ e McNatty et al.¹⁶. O dia da divergência folicular não apresentou efeito de época. O diâmetro máximo dos folículos dominantes não demonstrou diferença ($P > 0,05$) entre as duas épocas experimentais (E1: $10,17 \pm 1,12$ mm e E2 : $9,54 \pm 0,77$ mm). Valores semelhantes foram encontrados em novilhas Nelore (10 a 12 mm).¹⁷

A taxa de crescimento dos folículos dominantes variou de $0,28 \pm 0,12$ mm/dia na E1 e $0,66 \pm 0,22$ mm/dia na E2, sendo observado efeito significativo de época. Esses valores são inferiores aos encontrados para animais da raça Nelore ($0,92$ mm/dia).¹⁷ A duração do crescimento dos folículos dominantes também variou significativamente de acordo com a época estudada (E1- $15,50 \pm 4,90$ dias vs E2- $10,29 \pm 3,80$ dias), parecendo ser necessário o aumento da fase de crescimento folicular para ser alcançado o diâmetro ovulatório no verão. O diâmetro máximo do folículo

dominante na estação mais quente foi de $10,17 \pm 1,12$ mm, no inverno o maior diâmetro foi de $9,54 \pm 0,77$ mm. Não foi observada influência de época sobre a população de folículos pequenos (3-6 mm).

O intervalo estral foi uma característica que apresentou diferença significativa entre as épocas avaliadas, onde no verão (E-1) foi identificado um período mais longo para a detecção do estro, como demonstrado na tabela 1. As demais características não divergiram entre as duas épocas.

$32,37 \pm 1,59$ °C na E2, demonstrando diferenças ($P < 0,05\%$) significativas.

Com o aumento ou diminuição brusca da temperatura ambiente, fora da faixa de conforto térmico dos animais, a fertilidade é muito alterada, principalmente quando as temperaturas elevadas estão associadas a umidades atmosféricas elevadas.

Na E1 do presente estudo, o THI (índice de temperatura e umidade) apresentou um valor médio de 94 e na E2 o valor foi de 86. Estas médias podem

Tabela 1 - Características da dinâmica folicular de novilhas Guzerá durante duas épocas experimentais (E1-verão e E2-inverno)

Época	N	Características	Médias
1	6	IE(dias)	$23,67 \pm 3,44^a$
2	6	IE(dias)	$18,50 \pm 3,76^b$
1	6	DO(dias)	$15,83 \pm 5,91^a$
2	6	DO(dias)	$11,83 \pm 4,36^a$
1	6	DDO	$1,67 \pm 1,21^a$
2	6	DDO	$2,17 \pm 0,75^a$
1	6	DDF	$4,83 \pm 1,33^a$
2	6	DDF	$5,33 \pm 2,07^a$

Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma mesma característica, diferem entre si, ao nível de 5 %, pelo teste SNK. N = número de observações; IE = intervalo estral; DO = duração da onda folicular; DDO = dia da detecção da onda folicular; DDF = dia da divergência folicular.

A temperatura retal mínima variou de $37,92 \pm 0,20$ °C na E1 e $37,10 \pm 0,10$ °C na E2. A temperatura retal máxima oscilou entre $40,48 \pm 0,22$ °C e $38,95 \pm 0,08$ °C no verão e inverno, respectivamente. Esses valores demonstram o efeito ($P > 0,05$) da estação do ano na temperatura retal das novilhas Guzerá.

O aumento em um grau ou mais na temperatura corporal interna, resulta um grande dispêndio de energia para manutenção da homeostase. Neste processo regulatório as funções menos vitais (produção e reprodução) são comprometidas.⁴ A média da temperatura máxima detectada no ambiente do experimento na E1 foi de $37,83 \pm 0,58$ °C e

caracterizar a possibilidade de queda acentuada na produção animal, uma vez que o THI 72 é indicio de início de desconforto e, a partir do THI 76, a eficiência produtiva é comprometida. Estes valores foram estabelecidos para os animais de aptidão leiteira, mas podem ser utilizados como parâmetro para indicar o estado de estresse dos animais de corte.¹⁸ As concentrações de progesterona não demonstraram efeito de época ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS/STAT.⁹

Pode-se notar a influência do estresse térmico sobre as estruturas coletadas quando se observa a tabela 2, onde as avaliações foram realizadas por meio de estatística descritiva. O número total de estruturas

Tabela 2 - Número de estruturas (total, viáveis, não-viáveis e ovócitos) recuperadas de novilhas Guzerá, coletadas no sétimo dia após a IA e o número de corpos lúteos observados, durante a E1 e E2

	E1 (n = 6)	E2 (n = 6)
Total	17,0	20,0
Viáveis	7,0	18,0
Não-viáveis	2,0	2,0
Ovócitos	8,0	-----
Corpo lúteo	20,0	25,0

E1 = janeiro à março e E2 = maio à junho. n = número de animais.

recuperadas foi similar entre as duas épocas (17 na E1 e 20 na E2), entretanto, quando se observa o número de embriões viáveis (7 - E1 e 18 - E2) e de ovócitos (8 - E1 e 0 - E2) que foram recuperados em cada estação, é possível sugerir que houve efeito do estresse térmico no desenvolvimento embrionário inicial e/ou na taxa de fertilização.

O alto número de ovócitos não fertilizados, encontrados no verão são compatíveis com os achados de Monty e Racowsky¹⁹, que realizaram coletas nos meses de calor intenso e também observaram maior incidência de ovócitos não fecundados. Uma das causas deste fato, segundo esses autores, é a manutenção das concentrações basais de progesterona em doadoras expostas ao estresse térmico. Nestas condições, a qualidade dos ovócitos poderia comprometer a fecundação.

Não pode ser descartada a hipótese de que um ambiente uterino com temperatura acima dos valores normais tenha reduzido a capacidade de fertilização dos espermatozoides, com conseqüente comprometimento da viabilidade espermática.

Na E1 foram encontrados embriões de doadoras superovuladas com alterações morfológicas, tais como, blastômeros extrusados, coloração irregular e a presença de grânulos enegrecidos, ratificando os achados de Putney, Drost e Thatcher²⁰.

As alterações na dinâmica folicular em decorrência do estresse térmico, como diminuição da taxa de crescimento e

prolongamento na duração do crescimento folicular, podem afetar a subsequente funcionalidade do corpo lúteo e a secreção de progesterona, resultando em um ambiente uterino e de oviduto inóspito para o desenvolvimento embrionário. Nestas condições, os processos de capacitação, transporte do ovócito ou dos espermatozoides, fecundação, nidação e o desenvolvimento embrionário inicial estarão comprometidos. Observações semelhantes foram feitas por Breuel, Lewis e Schrick²¹. Esta realidade pode ser mais evidenciada em animais de aptidão leiteira, que apresentam um padrão racial direcionado para o gado europeu.

Conclusões

Os intervalos estrais e ovulatórios foram de maior duração durante o período de temperaturas mais elevadas (E1), possivelmente por comprometimento do desenvolvimento folicular. A taxa e a duração de crescimento folicular se mostraram sensíveis às variações sazonais, influenciando o desenvolvimento da dominância folicular durante o período pré-ovulatório. Ambientes com temperatura e umidade elevadas comprometem a viabilidade dos embriões e aumentam o número de oócitos não fertilizados. Conclui-se então, que determinadas características de relevante importância na fisiologia reprodutiva de novilhas Guzerá, apresentam significativa sensibilidade às variações térmicas, podendo refletir em instabilidades na fertilidade destes animais.

Ovarian follicular dynamic and embryo production seasonality in Guzerá heifers breed

Abstract

The objective was to verify the effects of seasonality on ovarian follicular dynamic and evaluate the influence of heat stress on early embryonic development in Guzerá heifers. Six animals were synchronized and the estrus day was considered D0. Follicular dynamic was followed by two consecutive estrous cycles, at times 1 (summer) and 2 (winter), using an ultrasonographic Scanner 200 Vet (Pie Medical). After nine days of the end of second estrous cycle, all the animals were submitted to superovulatory treatment, with duration of four days. The animals

Key words:

Follicular dynamic.
Thermal stress.
Guzerá. Embryos.
Superovulation.

were artificially inseminated, 12 to 24 hours after estrus detection. Embryo collection was realized seven days after the first insemination. There was seasonal effect on the number of follicular waves, with a greater prevalence of cycles with one wave in the summer. The intervals between estrus and ovulations showed a greater duration in the summer. There was a significant effect of time on the duration of the ovulatory follicle growth that was longer in the summer. The follicular growth rate was smaller in the summer. Rectum temperature oscillated between times, become evident the influence ($P < 0.05$) of season on the internal body temperature. The THI observed on summer was 94 and winter was 86, these values suggest the animal stress condition. The number of viable structures was higher in winter, suggesting the effects on time 2 on fertilization of the oocytes. Progesterone concentrations did not have seasonal effect. Thermal stress alterations on follicular dynamic, such do reduced follicular growth rate and increase on duration of follicular growth. Might prejudice the quality of oocyte and affect the subsequent corpus luteum functionality.

Referências

- 1 LAMOTHE-ZVALETA, C.; FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H. Reproductive performance of zebu cattle in Mexico. 1. Sexual behavior and seasonal influence on estrus cyclicity. **Theriogenology**, v. 36, p. 887-896, 1991.
- 2 PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2a norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667-681, 1998.
- 3 BARROS, C. M. et al. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.
- 4 HANSEN, P. J. et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.
- 5 BADINGA, L. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, p. 797-810, 1993.
- 6 WOLFENSON, D. et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1106-1113, 1995.
- 7 LINDER, G. M.; WRIGTH, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20: n. 4, p. 407-416, 1983.
- 8 ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: um guia de procedimentos e informações gerais para uso da tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários**. 3. ed. [s.l.]: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. p. 109-140.
- 9 SAS - **Statistical Analysis System**, Cary, 1996.
- 10 BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p. 9-22, 1995.
- 11 GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil**, v. 87, p. 223-230, 1989.
- 12 SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biol Reprod**, v. 39, p. 308-317, 1988.
- 13 WILSON, W. J. et al. Effects of a controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2132-2138, 1998b.
- 14 LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.
- 15 WILSON, S. J. 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.
- 16 MCNATTY, K. P. et al. Seasonal differences in ovarian activity in cows. **J. Endocr**, v. 102, p. 189-198, 1984.
- 17 FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489 -1505, 1997.
- 18 ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **J. Dairy Sci**, v. 77, p. 2044-2050, 1994.
- 19 MONTY, D. E. Jr.; RACOWSKY, C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. **Theriogenology**, v. 28, p. 451-465, 1987.
- 20 PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development I dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 and 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, p. 195-209, 1988.
- 21 BREUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; SCHRICK, F. N. Factors affecting fertility in post partum cow: role of oocyte and follicle in conception rate. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 655-661, 1993.