

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO E DO FLUIDO FOLICULAR E
QUALIDADE OVOCITÁRIA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O
PÓS-PARTO NO VERÃO E INVERNO**

Bênner Geraldo Alves
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Lúcia Gambarini

GOIÂNIA
2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Bêner Geraldo Alves** E-mail: **bennervet@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: _____ Agência de fomento: _____

País: _____ UF: _____ CNPJ: _____ Sigla: _____

Título: Perfil bioquímico sérico e do fluido folicular e qualidade ovocitária em vacas leiteiras durante o pós-parto no verão e inverno Palavras-chave: **balanço energético, eletrólitos, estresse térmico, fluido folicular, ovócito, vaca leiteira**

Título em outra língua: **Biochemical profile of serum and follicular fluid and oocyte quality of dairy cows during postpartum on summer and winter**

Palavras-chave em outra língua: **energy balance, electrolytes, heat stress, follicular fluid, oocyte, dairy cattle**

Área de concentração: **Produção Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **24/01/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Maria Lúcia Gambarini** E-mail: **mlgambarini@hotmail.com**

Co-orientador(1): **Benedito Dias de Oliveira Filho** E-mail: **bene@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **José Octávio Jacomini** E-mail: **jojacomini@ufu.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 13 de fevereiro de 2013


 Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

BÊNNER GERALDO ALVES

**PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO E DO FLUIDO FOLICULAR E
QUALIDADE OVOCITÁRIA EM VACAS LEITEIRAS DURANTE O
PÓS-PARTO NO VERÃO E INVERNO**

Tese apresentada para obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás.

Área de Concentração

Produção Animal

Linha de pesquisa

Biotecnologia e Eficiência Reprodutiva Animal

Orientadora

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Gambarini

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho

Prof. Dr. José Octavio Jacomini

GOIÂNIA

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

A474p Alves, Bênnen Geraldo.
Perfil bioquímico sérico e do fluido folicular e
qualidade ovocitária em vacas leiteiras durante o pós-parto
no verão e inverno [manuscrito] / Bênnen Geraldo Alves. -
2013.
112 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini; Comitê
de Orientação: Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho,
Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

Bibliografia.

1. Bovino de leite (girolando) – Balanço energético
negativo. 2. Bovino de leite (girolando) – Estresse térmico.
I. Título

CDU: 632.2.082

BENNER GERALDO ALVES

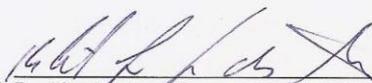
Tese defendida e aprovada em **24/01/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



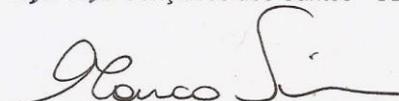
Prof. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Dyomar Toledo Lopes – UFG/Jatai-GO



Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos - UEG/GO



Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira Viu - UFG/Jatai-GO



Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho - DMV/EVZ/UFG

RESUMO

Considerável número de publicações têm reportado o declínio da eficiência reprodutiva em vacas leiteiras e existem evidências de associação entre alta produção de leite com distúrbios reprodutivos, predisposição para o balanço energético negativo (BEN) e qualidade inferior do ovócito. Outro fator que contribui para a baixa fertilidade é o estresse térmico (ET), que associado à elevada produção de calor metabólico, torna a vaca lactante mais susceptível aos seus efeitos. No Brasil, a raça Girolando evoluiu zootecnicamente nas últimas décadas e sua maior capacidade de adaptação às condições ambientais, tem se mostrado uma alternativa interessante para a produção de leite nos trópicos. No entanto, até o momento nenhum estudo abordou os efeitos do BEN e do ET sobre o perfil metabólico e do fluido folicular de folículos dominantes, a dinâmica folicular e a qualidade dos ovócitos durante a lactação em diferentes estações do ano, logo o entendimento destes parâmetros torna-se de fundamental importância para avaliação do potencial produtivo da raça. Os resultados deste estudo demonstram que os desafios BEN e ET no início da lactação diminuem o escore de condição corporal e alteram as concentrações séricas e foliculares de diversos metabólitos, indicando que tais mudanças são refletidas no ambiente folicular de folículos dominantes podendo comprometer a qualidade do ovócito e das células da granulosa. Além disso, os dados revelam que variáveis clínicas e meteorológicas podem influenciar a foliculogênese, a dominância folicular e a qualidade ovocitária. Dessa forma, esses resultados são importantes para o entendimento da patogênese da subfertilidade que acomete bovinos leiteiros durante o pós-parto e sob condições ambientais desfavoráveis.

Palavras-chave: balanço energético, estresse térmico, fluido folicular ovócito, vaca leiteira

À minha esposa, Kele Amaral Alves, pelo amor e apoio.

Aos meus filhos Gabriel e Giovanna.

Aos meus pais, Vera e Klinger, sempre presentes.

Aos meus irmãos e amigos eternos Braynner e Henner.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade, saúde e fé. À minha orientadora Prof^a. Dra. Maria Lúcia Gambarini pela confiança, sabedoria, amizade e credibilidade dispensados ao longo do período de doutoramento. Sua disponibilidade e paciência foram essenciais, transformando as dificuldades do dia a dia em pequenos obstáculos. Obrigado pela oportunidade.

Aos meus tios (João e Zélia) e primos (Rafael e Daniela) pelo apoio em Goiânia. Sem vocês esta etapa não poderia ser vencida. Muito obrigado.

Aos professores Dr. Marcelo Emílio Beletti e Dr. José Octavio Jacomini pelos ensinamentos dedicados, amizade, sabedoria, apoio e sugestões que contribuíram para o aprimoramento pessoal e acadêmico. Aos professores dos laboratórios de reprodução animal Dra. Ricarda Maria dos Santos, Dra. Teresinha Inês de Assumpção e Dr. Benedito D. Oliveira Filho, pela amizade e convívio agradável.

Aos técnicos dos laboratórios de reprodução animal e histologia da Universidade Federal de Uberlândia, bioquímica da Universidade Federal de Goiás e laboratório de análises do hospital Amparo de Goiânia: Maria Helena, Elton, Fabrício e Mariane pela amizade e apoio técnico prestado ao desenvolvimento deste trabalho, sem o qual seria impossível realizá-lo. Aos funcionários Divino e Márcio da fazenda Glória - UFU, pela ajuda durante a execução do experimento com as vacas leiteiras. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas graduandos, mestrandos, doutorandos e doutores Muller, Thiago, Lucas, Bruna, Paulo, Emílio, Eduardo Vale, Gabriel, Pedro, Raissa, Svetlana, Manuella, Juliana, Eduardo Mazon, Tayrone, Thiago Vilar, Rodrigo, Liliane, Suzana, Jussara, Ivan Salamanca, Flávia e Aline pela amizade e bons momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Viu e sua equipe, pelos ensinamentos dedicados, importantes para a execução deste trabalho. Agradeço à Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Ciência Animal.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para esta pesquisa. Os meus sinceros agradecimentos.

*“É inútil querermos ser bons o tempo todo e fazer tudo certo,
o que importa é estarmos dispostos a fazer um pouco melhor hoje
do que fizemos ontem”*

Nietzsche,
Filósofo Alemão

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução.....	1
1.1 Foliculogênese e Dinâmica Folicular.....	3
1.2 Balanço Energético Negativo.....	7
1.2.1 Escore de Condição Corporal.....	7
1.2.2 Influência Hormonal e Metabólica na Qualidade do Ovócito.....	8
1.3 Estresse Térmico e Fertilidade.....	14
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Gerais.....	18
1.4.2 Específicos.....	18
1.5 Referências.....	19
CAPÍTULO 2 - Perfil metabólico sérico e do fluido folicular de vacas Girolando (<i>Bos taurus taurus x Bos taurus indicus</i>) no pós-parto, durante o verão e inverno.....	31
2. Introdução.....	33
2.1 Material e Métodos.....	35
2.1.1 Animais e Local.....	35
2.1.2 Variáveis Clínicas e Meteorológicas.....	36
2.1.3 Aspiração Folicular Transvaginal Guiada por Ultrassonografia.....	37
2.1.4 Obtenção das Amostras de Soro Sanguíneo e Fluido Folicular.....	37
2.1.5 Análise Bioquímica do Soro Sanguíneo e Fluido Folicular.....	38
2.1.6 Análise estatística.....	38
2.2 Resultados.....	40
2.3 Discussão.....	51
2.4 Conclusão.....	58
2.5 Referências.....	59
CAPÍTULO 3 - Atividade ovariana e qualidade do ovócito associado ao perfil bioquímico sérico e do fluido folicular de vacas Girolando (<i>Bos taurus taurus x Bos taurus indicus</i>) durante o pós-parto, no verão e inverno.....	69
3. Introdução.....	71
3.1 Material e Métodos.....	73

3.1.1 Animais e Local.....	73
3.1.2 Temperatura Retal, Escore de Condição Corporal e Variáveis Meteorológicas.....	73
3.1.3 Aspiração Folicular Transvaginal Guiada por Ultrassonografia.....	74
3.1.4 Classificação do Ovócitos.....	75
3.1.5 Obtenção das Amostras de Sangue.....	75
3.1.6 Análise Bioquímica - Soro e Fluido Folicular.....	76
3.1.7 Análise Estatística.....	76
3.2 Resultados.....	78
3.3 Discussão.....	87
3.4 Conclusão.....	91
3.5 Referências.....	92
CAPÍTULO 4 - Considerações Finais.....	98

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 - Representação esquemática da foliculogênese nos mamíferos..... 3
- FIGURA 2 - Ultrassonografia transretal de ovário bovino..... 5
- FIGURA 3 - Alterações endócrinas ocorridas durante o ciclo estral bovino. 5
- FIGURA 4 - Mecanismo metabólico correlacionando o balanço energético negativo e a qualidade do ovócito em vacas leiteiras de alta produção..... 12
- FIGURA 5 - Efeito da estação do ano sobre a taxa de concepção de vacas primíparas e múltiparas..... 15

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Média \pm (epm) das variáveis climáticas: (a) índice de temperatura e umidade (ITU) e (b) temperatura ambiente (TA), durante as aspirações foliculares ocorridas nas estações do verão e inverno..... 40
- FIGURA 2 - Média \pm (epm) do escore de condição corporal (ECC) e frequência respiratória (FR) de vacas leiteiras avaliadas durante o pós-parto no verão e inverno..... 41
- FIGURA 3 - Concentração média \pm (epm) de glicose (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno..... 42
- FIGURA 4 - Concentração média \pm (epm) de colesterol total (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. 43
- FIGURA 5 - Concentração média \pm (epm) de triglicérides (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. 44
- FIGURA 6 - Concentração média \pm (epm) de ureia (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno..... 45

FIGURA 7 -	Concentração média \pm (epm) de sódio (mmol/L) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno.....	46
FIGURA 8 -	Concentração média \pm (epm) de potássio (mmol/L) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno.....	47
FIGURA 9 -	Concentração média \pm (epm) de cálcio (mmol/L) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno.....	48
FIGURA 10 -	Relação entre produção de leite, concentrações séricas de glicose e triglicérides e perda de escore de condição corporal (ECC), em pontos, até 90 dias de lactação em vacas da raça Girolando. Dados das variáveis obtidos nas estações do verão e inverno e expressos na forma de média ajustada pelos quadrados mínimos.....	50
CAPÍTULO 3		
FIGURA 1 -	Média \pm (epm) do escore de condição corporal (ECC) e temperatura retal (TR) de vacas Girolando durante o pós-parto nas estações do verão e inverno.....	79
FIGURA 2 -	Média \pm (epm) de folículos ovarianos antes da aspiração folicular transvaginal entre 30 e 90 dias do pós-parto durante o verão e inverno.....	80
FIGURA 3 -	Média \pm (epm) de ovócitos total (a) e viável (b) recuperados de vacas Girolando por sessão de aspiração folicular transvaginal nas estações do verão e inverno entre 30 e 90 dias de lactação.....	81
FIGURA 4 -	Classificação quanto à qualidade dos ovócitos obtidos (média \pm epm) de vacas Girolando após aspiração folicular transvaginal durante o verão e inverno entre 30 e 90 dias de lactação.....	82
FIGURA 5 -	Distribuição da qualidade dos ovócitos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação submetidas à aspiração folicular transvaginal durante o verão e inverno.....	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 -	Comparação entre dinâmica folicular de vacas em lactação e novilhas Holandesas.....	6
TABELA 2 -	Taxa de fertilização e qualidade de embriões de vacas Holandesas avaliadas em diferentes estações do ano.....	16
TABELA 3 -	Taxas de concepção (TC) aos 28 e 42 dias em vacas detectadas em estro e que ovularam.....	17

CAPÍTULO 2

TABELA 1 -	Composição percentual (% MS) dos ingredientes e análise bromatológica das dietas utilizadas durante as estações do verão e inverno.....	36
TABELA 2 -	Coeficientes de correlação (r) entre metabólitos e eletrólitos no fluido folicular de folículos dominantes (≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto.....	49

CAPÍTULO 3

TABELA 1 -	Média \pm (epm) e variação da temperatura ambiente (TA), umidade relativa (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período avaliado nas estações do verão e inverno.....	78
TABELA 2 -	Efeito da estação (verão e inverno) sobre a concentração média \pm (epm) de metabólitos no soro e fluido folicular de vacas Girolando entre 30 e 90 dias pós-parto.....	84
TABELA 3 -	Coeficientes de correlação (r) das variáveis clínicas (TR, ECC e peso corporal) e climáticas (ITU, TA e UR) com população folicular, número e qualidade de ovócitos obtidos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação.....	85
TABELA 4 -	Coeficientes de correlação (r) entre metabólitos no soro e população folicular, número e qualidade de ovócitos obtidos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AFT	Aspiração folicular transvaginal
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
B-HBA	Betahidroxibutirato
BEN	Balanço energético negativo
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
CCO	Complexo cúmulus ovócito
CT	Colesterol total
CWA	Classificação climática de Köppen-Geiger
DEG	Ovócitos degenerados
dL	Decilitro
ECC	Escore de condição corporal
epm	Erro padrão da média
ET	Estresse térmico
E ₂	Estrógeno
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FF	Fluido folicular
FSH	Hormônio folículo estimulante
GI	Ovócito grau I
GII	Ovócito grau II
GIII	Ovócito grau III
GH	Hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
g	Força g
G	Gauge
IA	Inseminação artificial
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina
IMS	Ingestão de matéria seca
ITU	Índice de temperatura e umidade
K	Potássio

kg	Kilograma
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
mmol	Milimol
mg	Miligrama
MS	Matéria seca
Mcal	Megacaloria
Na	Sódio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
ng	Nanograma
pg	Picograma
pol	Polegadas
P ₄	Progesterona
PB	Proteína bruta
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
r	Coeficiente de correlação
TA	Temperatura ambiente
TE	Transferência de embriões
TC	Taxa de concepção
TG	Triglicérides
TR	Temperatura retal
UR	Umidade relativa do ar

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O pré-requisito para um bom desempenho da vaca leiteira durante sua vida reprodutiva é a produção de descendentes em intervalos regulares. Nesse sentido, existe uma preocupação da indústria leiteira em relação à eficiência reprodutiva durante a lactação que pode influenciar a produção diária de leite, a média de dias em lactação, o número de bezerros nascidos por ano, o intervalo de gerações e a viabilidade da atividade (LEROY et al., 2008a; LIMA et al., 2010).

Um número considerável de publicações têm reportado o declínio da eficiência reprodutiva em vacas leiteiras e existem evidências de associação entre alta produção de leite com distúrbios reprodutivos (LUCY, 2001; KIM et al., 2003), predisposição para maior grau de balanço energético negativo (BEN) durante a lactação (VEERKAMP, 1998) e qualidade inferior do ovócito (WALTERS et al., 2002a), embora tal relação direta não seja apontada por outros estudos (PATTON et al., 2007; MATOBA et al., 2012). BUTLER (1998) demonstrou o declínio da taxa de concepção ao primeiro serviço de aproximadamente 65% em 1951 para 40% em 1996. Para vacas inseminadas artificialmente após observação de estro os índices de concepção eram de 50% em 1950 contra 34% atualmente reportados (YUSUF et al., 2011), reduzindo para 25% quando se utiliza a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (LIMA et al., 2009).

Alterações metabólicas e hormonais ocasionadas pelo BEN durante o início da lactação podem atuar como sinalizadores para o sistema reprodutivo, constituindo um mecanismo de adaptação para proteger a vaca de uma possível sobrecarga metabólica adicional causada pela gestação (PUSHPAKUMARA et al., 2003). A redução das taxas de concepção pós-parto tem sido associada com o elevado metabolismo de esteroides, devido a alta ingestão de alimentos, e mudanças no perfil hormonal do fluido folicular de folículos dominantes (LEROY et al., 2004a).

Outro fator que contribui para a baixa fertilidade é o estresse térmico (ET), que associado à elevada produção de calor metabólico, devido a produção

de leite, torna a vaca lactante mais susceptível aos seus efeitos. Caracterizado como problema mundial (WOLFENSON et al., 2000), o ET afeta cerca de 60% da população de bovinos. CHEBEL et al. (2004) demonstraram que nas estações mais quentes do ano houve o decréscimo entre 10 e 30% nas taxas de concepção. A baixa expressão de estro, alterações na dinâmica folicular, mudança do perfil endócrino e metabólico com reflexo no fluido folicular e a inferior qualidade de ovócitos e embriões são algumas das consequências do ET sobre o sistema reprodutivo (DE RENSIS & SCARAMUZZI, 2003; SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010).

Devido ao declínio da capacidade reprodutiva de vacas da raça Holandesa, tem aumentado o interesse pelo cruzamento entre raças leiteiras, que pode ser atribuído a três razões. Em primeiro lugar, mudanças no preço do leite têm recompensado rebanhos com capacidade de produção de leite com maior teor de gordura e proteína, o que tem determinado a inserção de outras raças. Segundo, alguns produtores começaram a experimentar certos tipos de cruzamentos por causa da preocupação com a fertilidade, facilidade de parto, saúde e longevidade reprodutiva. Terceiro, os níveis de endogamia estão aumentando rapidamente nas principais raças leiteiras, e os cruzamentos podem ser uma opção eficaz para reduzir o impacto da depressão endogâmica em fazendas leiteiras comerciais (WEIGEL & BARLASS, 2003).

Dessa forma, outras pesquisas têm abordado as diferenças fisiológicas entre grupos genéticos e seus efeitos sobre o desempenho reprodutivo durante a lactação (HEINS et al., 2008; BROWN et al., 2012). No Brasil, a raça Girolando (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) evoluiu zootecnicamente nas últimas décadas e sua maior capacidade de adaptação às condições ambientais, devido a presença de genes para tolerância térmica do grupamento genético zebu (*Bos taurus indicus*) (HANSEN, 2004), tem se mostrado uma alternativa interessante para a produção de leite nos trópicos. No entanto, até o momento para a raça Girolando, nenhum estudo abordou os efeitos do balanço energético negativo e do estresse térmico sobre o perfil metabólico e do fluido folicular de folículos dominantes, a dinâmica folicular e a qualidade dos ovócitos durante a lactação em diferentes estações do ano, logo o entendimento destes parâmetros torna-se de fundamental importância para avaliação do potencial produtivo da raça.

1.1 FOLICULOGÊNESE E DINÂMICA FOLICULAR

O ovário dos mamíferos contém folículos em diversos estágios de desenvolvimento (Figura 1) e são regulados por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos que agem coordenadamente, selecionando-os até a ovulação (MATSUDA et al., 2012). Para isso, são necessárias mudanças morfológicas e funcionais resultando na diferenciação celular e desenvolvimento ovocitário (PALMA et al., 2012). A reserva folicular, na forma de folículos pré-antrais primordiais (~95% da população folicular), é mantida em quiescência e sua manutenção e sobrevivência são importantes para o fornecimento de ovócitos ao longo da vida reprodutiva (KIM et al., 2012).

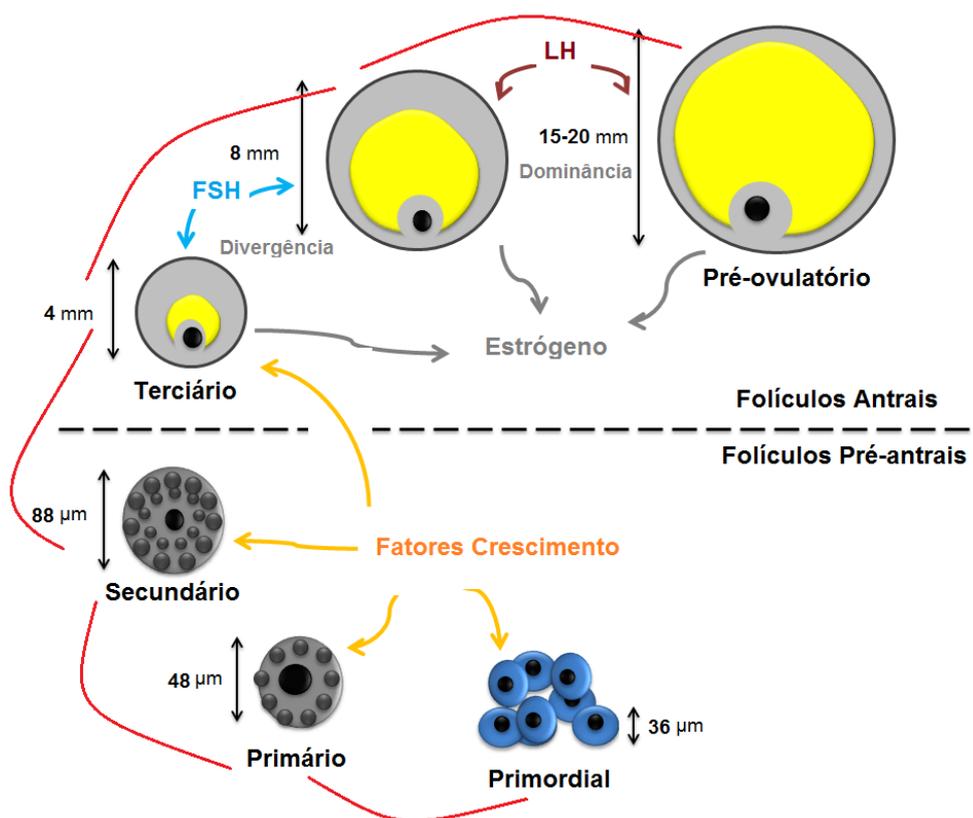


FIGURA 1 - Representação esquemática da foliculogênese nos mamíferos. Processo de desenvolvimento folicular dependente de fatores de crescimento durante a fase pré-antral e gonadotrofina dependente na fase antral.

Avanços na compreensão da dinâmica folicular ocorreram após a utilização da ultrassonografia transretal que permitiu o monitoramento diário de folículos ovarianos (Figura 2). Em espécies monovulatórias (bovinos, equinos e humanos) a seleção folicular é o processo no qual um folículo ovulatório se desenvolve a partir do *pool* de folículos recrutados na forma de ciclos de crescimento folicular. Em cada onda folicular ocorrem cinco etapas sucessivas conhecidas como recrutamento, seleção, divergência, dominância, ovulação ou atresia folicular (Figura 3) (GINTHER et al., 2001; MOORE & TATCHER, 2006).

ALVES et al. (2002) avaliaram a dinâmica folicular e a duração do ciclo estral em diferentes grupamentos genéticos de acordo com o grau de sangue Holandês e Zebu. Os grupos apresentaram comportamento semelhante, com predominância de duas ondas (78%) foliculares por ciclo estral em relação à uma (6%) e três ondas (16%). O período interovulatório dos ciclos com três ondas mostrou-se mais longo ($25,3 \pm 4,3$ dias) em comparação com uma ($16,0 \pm 3,6$ dias) e duas ($21,8 \pm 1,7$ dias) ondas foliculares. A duração das ondas foliculares para ciclos estrais com três ondas de crescimento folicular foi de $11,0 \pm 3,6$; $7,1 \pm 1,6$; e $8,5 \pm 1,5$ dias na 1^a, 2^a e 3^a ondas, respectivamente, e de $11,1 \pm 1,6$ e $12,0 \pm 2,3$ dias nos ciclos estrais com duas ondas foliculares. Os dias de maior concentração plasmática de progesterona no 1^o e 2^o ciclo estral consecutivo avaliado em cada grupo foram aos $13,6 \pm 3,0$ ($7,2 \pm 4,3$ ng/mL) e $11,8 \pm 3,4$ ($5,6 \pm 2,0$ ng/mL) dias, respectivamente, não se mostrando diferentes entre os grupamentos genéticos e ciclos estrais estudados.

SARTORI et al. (2004) compararam a função ovariana e o perfil endócrino durante o ciclo estral entre vacas em lactação e novilhas Holandesas (Tabela 1). O estudo demonstrou que vacas lactantes tiveram maior incidência de falha na ovulação após a luteólise e ovulações múltiplas. Além disso, as vacas em lactação apresentaram concentrações séricas de esteroides (estrógeno e progesterona) menores que as novilhas, apesar de apresentarem maior diâmetro de folículo ovulatório e corpo lúteo, sugerindo que as diferenças observadas podem ser explicadas devido ao maior metabolismo de esteroides das vacas em lactação (SANTOS & VASCONCELOS, 2006).

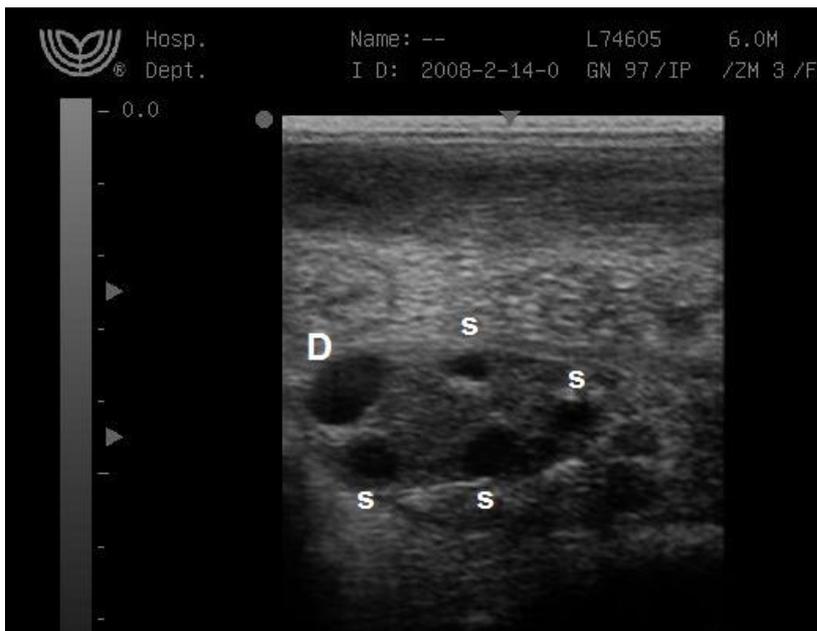


FIGURA 2 - Ultrassonografia transretal de ovário bovino com folículos ovarianos, caracterizados por estruturas anecóicas arredondadas. Folículo dominante (D) e folículos subordinados (s) da onda de crescimento folicular.

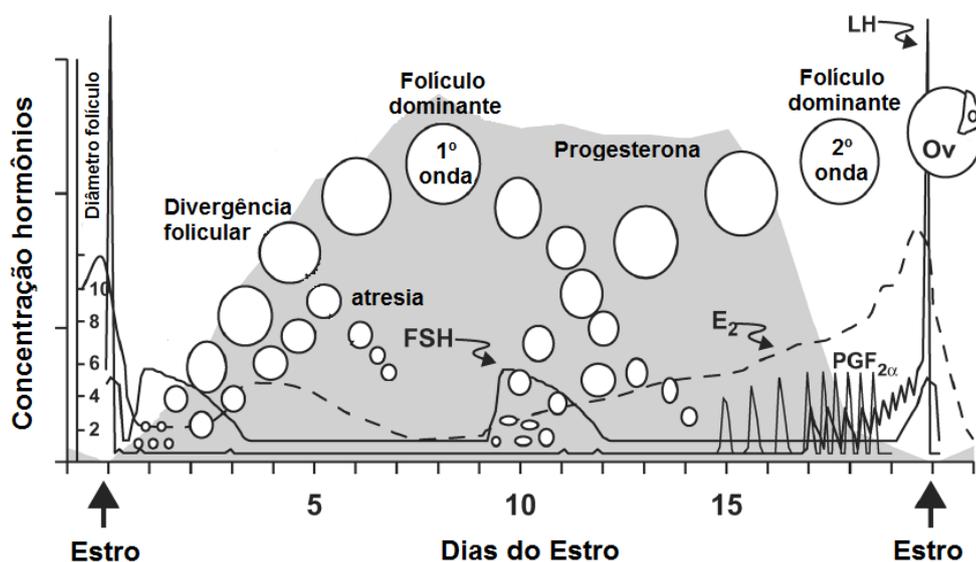


FIGURA 3 - Alterações endócrinas ocorridas durante o ciclo estral bovino. E₂: estrógeno; FSH: hormônio folículo estimulante; LH: hormônio luteinizante; Ov: folículo pré-ovulatório; PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}. Adaptado de MOORE & TATCHER (2006).

TABELA 1 - Comparação entre dinâmica folicular de vacas em lactação (n=14) e novilhas Holandesas (n=27)

Características Avaliadas	Vacas em Lactação	Novilhas	P ≤
Intervalo de ovulações (dias)	22,9 ± 0,7	22,0 ± 0,4	0,28
Ciclos com 2 ondas (%)	78,6	55,6	0,15
Ciclos com 3 ondas (%)	14,3	33,3	0,19
Ciclos com 4 ondas (%)	7,1	11,1	0,68
Dia de emergência da 2 ^o onda folicular	11,1 ± 0,6	8,9 ± 0,3	0,0003
Ovulações múltiplas (%)	17,9	1,9	0,02
Concentração de E ₂ no soro (pg/mL)	7,9 ± 0,8	11,3 ± 0,6	0,001
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	16,8 ± 0,5	14,9 ± 0,2	0,001
Concentração de P ₄ no soro (ng/mL)	5,6 ± 0,5	7,3 ± 0,4	0,008
Volume do corpo lúteo (mm ³)	11120 ± 678	7303 ± 308	0,001

Adaptado de SARTORI et al. (2004)

1.2 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO

1.2.1 Escore de condição corporal

Na vaca leiteira, durante o início da lactação, os requisitos energéticos para manutenção e produção de leite excedem a energia disponibilizada pela ingestão de alimento, resultando em um estado de desequilíbrio entre entrada e saída de energia denominado balanço energético negativo (BEN) (WALTERS et al., 2002b). Esta condição energética pode ser mensurada em vacas leiteiras de três formas: medição de todos os insumos (ingestão de alimentos) e gastos de energia (manutenção, leite, feto), monitoramento da condição corporal (peso e escore) no pós-parto ou medição do equilíbrio de energia a partir de dados de produção e composição do leite quanto aos níveis de gordura e proteína. O acompanhamento da mudança corporal é viável do ponto de vista prático, mas não adequado para avaliar mudanças de curto prazo no estado de energia. A terceira opção possibilita um cálculo mais confiável que pode ser utilizado periodicamente em rebanhos comerciais (FRIGGENS et al., 2007).

O nadir do BEN ocorre entre 2,5 e 12 dias pós-parto e o equilíbrio entre a energia ingerida pela alimentação e a requerida para manutenção e produção ocorre em média aos 80 dias de lactação (COFFEY et al., 2002). A severidade do BEN depende mais da ingestão de alimentos do que da produção de leite, no entanto, ambos são considerados fatores de risco para o seu estabelecimento (KENDRICK et al., 1999). Outro fator que influencia o BEN é o escore de condição corporal (ECC) no pré-parto, pois ECC inferior a 3,0 (escala de 1 a 5) está associado com redução na produção e desempenho reprodutivo e $ECC \geq 3,5$ é relacionado ao menor consumo de matéria seca e produção de leite no início da lactação, com aumento das chances de ocorrer distúrbios metabólicos, os quais por sua vez, interferem na atividade ovariana (GWAZDAUSKAS et al., 2000; ROCHE et al., 2009).

Durante anos, o foco principal na seleção de vacas leiteiras tem sido sobre as características de produção de leite, ocasionando o aumento da sua produção seguido por uma correspondente diminuição na capacidade de ingestão

de matéria seca (IMS). A capacidade genética para ingestão é influenciada pelo ECC ao parto e início da lactação, com associação negativa entre ECC e IMS (GARNSWORTHY & JONES, 1987; PATTON et al., 2007). JONES et al. (1999) reportaram valores genéticos para touros quanto ao escore corporal e observaram índices de herdabilidade de 0,20 a 0,28 durante a lactação das progênes avaliadas, sugerindo que estes indicadores podem ser utilizados na seleção de touros para o acasalamento.

1.2.2 Influência hormonal e metabólica na qualidade do ovócito

O maior mérito genético para produção tem efeitos negativos sobre a fertilidade, e o balanço energético é um importante regulador na retomada da atividade ovariana pós-parto. Sua duração prolongada altera concentrações hormonais, não oferecendo suporte ao sistema reprodutivo durante o início da lactação (VEERKAMP et al., 2001). Por razões econômicas é desejável que uma vaca leiteira seja inseminada até três meses pós-parto. No entanto, o número de ciclos ovulatórios que antecedem a inseminação é essencial para o aumento da proporção de vacas gestantes neste período (BUTLER & SMITH, 1989).

Estudos *in vivo* demonstraram que a reduzida absorção de energia no início da lactação altera o perfil metabólico e aumenta o intervalo parto primeira ovulação (OPSOMER et al., 2000). O BEN por meio da sinalização metabólica, combinada com baixa concentração de glicose e insulina no sangue, elevada concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e betahidroxibutirato (B-HBA) e acúmulo de triglicérides no fígado retardam a elevação dos níveis dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), necessários para estimulação dos folículos ovarianos, produção de estradiol e ovulação (BUTLER et al., 2006). As gonadotrofinas regulam a secreção das células da teca e da granulosa, bem como a produção de estrógeno e andrógeno pelos folículos. Dessa forma, a capacidade de desenvolvimento do ovócito está estreitamente ligada à fase de crescimento e desenvolvimento folicular (CARATY & FRANCESHINI, 2008).

RENAVILLE et al. (2010) observaram que a composição do fluido folicular de folículos ativos (razão estrógeno progesterona, $E_2/P_4 > 1$) e inativos ($E_2/P_4 < 1$) quanto a concentração de ácidos graxos foi influenciada pela atividade estrogênica e ambos foram diferentes do plasma. Da mesma forma, tem sido demonstrado em vacas leiteiras durante o pós-parto, a estreita relação entre perfil sérico e fluido folicular para diversos metabólitos (IGF-I: fator de crescimento semelhante a insulina, glicose, AGNE, ureia e colesterol total), onde suas alterações refletem na composição do ambiente folicular e, portanto, podem comprometer a qualidade do ovócito e das células da granulosa (SHEHAB-EL-DEEN et al. 2010).

Os hormônios metabólicos IGF-I e insulina são importantes mediadores da esteroidogênese e proliferação das células da granulosa por meio da ação de mecanismos autócrinos e parácrinos (KAWASHIMA et al., 2007). Concentrações circulantes de IGF-I diminuem na primeira semana pós-parto e estão relacionadas com o aumento dos intervalos parto ovulação e parto concepção (TAYLOR et al., 2003). Na vaca, o nível de IGF-I no fluido folicular é reflexo da concentração sérica, enquanto que o IGF-II é derivado localmente a partir das células da teca, com a função de suporte ao crescimento folicular e esteroidogênese (MAGALHÃES et al., 2012).

O IGF-I aumenta a resposta ovariana às gonadotrofinas e também estimula a proliferação de células foliculares e a produção de estradiol. A insulina age diretamente sobre o crescimento de folículos antrais, estimula a produção de estradiol e possui ação mitogênica semelhante ao IGF-I (LLEWELLYN et al., 2007). Sua concentração pode estar associada à retomada da atividade ovariana pós-parto, pois é o regulador primário das concentrações circulantes de IGF-I, por meio da expressão de receptores do hormônio de crescimento (GH) no fígado (BUTLER et al., 2004).

Em relação aos hormônios esteroides, SARTORI et al. (2004), demonstraram que vacas em lactação quando comparadas às novilhas apresentam menor concentração de E_2 (7,9 vs. 11,3 pg/mL) e P_4 (5,6 vs. 7,3 ng/mL) circulantes, apesar de possuírem folículo dominante e corpo lúteo maiores, sugerindo a relação destes achados com a alta incidência de anomalias reprodutivas como redução na expressão do estro, ovulações múltiplas e baixas

taxas de concepção. Além disso, o metabolismo hepático acelera a degradação de esteroides devido a alta ingestão de matéria seca, contribuindo para a diminuição do estrógeno no folículo pré-ovulatório (SANGSRITAVONG et al., 2002; SANTOS & VASCONCELOS, 2006).

Alterações nas concentrações de estrógeno interferem na correta maturação do ovócito, bloqueando o estágio de metáfase I ou induzindo o aumento de aberrações nucleares como a fragmentação dos microtúbulos durante a progressão da meiose (BEKER-van WOUDEBERG et al., 2004). Esse perfil endócrino alterado justifica o retardo do crescimento folicular e situações de falhas na ovulação, anovulação e baixa fertilidade observados em vacas leiteiras. Folículos persistentes geralmente possuem um ovócito de qualidade inferior devido a maturação nuclear prematura antes da onda de LH, que pode ser explicada pela diminuição de fatores relacionados à progressão da meiose, produzidos a partir das células da granulosa para o ovócito (REVAH & BUTLER, 1996).

COSTA et al. (2004) observaram que a relação entre estrógeno e testosterona no fluido folicular pode ser utilizada como um parâmetro preditivo para a taxa de maturação de ovócitos em mulheres. Por outro lado, ROTH et al. (2008) reportaram semelhantes volume e concentrações de estradiol, progesterona e androstenediona no fluido folicular de vacas e novilhas, assim como a porcentagem de ovócitos de qualidade superior e a proporção de ovócitos clivados e blastocistos produzidos *in vitro*, sugerindo que a diferença de fertilidade entre novilhas e vacas em lactação não está diretamente relacionada com o conteúdo de esteroides no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios ou na competência de desenvolvimento do ovócito.

Outros fatores como o fluxo sanguíneo perifolicular e concentração de óxido nítrico e esteroides no fluido folicular e sua relação com a qualidade do ovócito foram investigados. O óxido nítrico é um modulador local da função das células da granulosa e regulador do fluxo sanguíneo perifolicular, que quando associado ao estrógeno no fluido folicular, diminui a pulsatilidade da artéria ovariana, devido a vasodilatação e vascularização em torno do folículo pré-ovulatório em ratas e mulheres (BEN-SHLOMO et al., 1994; ANTEBY et al., 1996). POWERS et al. (1995) relataram a existência de uma barreira folicular

sanguínea importante para a função ovariana em camundongos. Além disso, sugeriram que essa barreira parece ser sensível aos efeitos fisiológicos do óxido nítrico, podendo ser regulada pelas gonadotrofinas. Recentemente, PANCARCI et al. (2012) concluíram que as concentrações de estrógeno, progesterona e óxido nítrico no fluido folicular, associado com presença de fluxo sanguíneo perifolicular, avaliado por ultrassonografia transvaginal com Doppler, podem ser utilizadas para determinar o estado funcional dos folículos em bovinos. Além disso, a determinação do fluxo sanguíneo antes da aspiração folicular transvaginal pode ser uma ferramenta útil na colheita de ovócitos com melhor qualidade, possibilitando o aumento na eficiência da fertilização *in vitro*.

O anestro pós-parto de vacas leiteiras não está somente relacionado a distúrbios endócrinos, mas pode ser causado por metabólitos produzidos em decorrência do BEN durante a lactação (Figura 4), que podem interferir diretamente na qualidade do ovócito (LEROY et al., 2008b). BRITT (1992) sugeriu que a duração total do desenvolvimento folicular a partir de folículos pré-antrais até o estágio de folículo pré-ovulatório é superior a 80 dias, dos quais 42 seriam relacionados à fase antral (LUSSIER et al., 1987). A exposição destes folículos às condições metabólicas adversas devido ao BEN ou estresse térmico (ET), nas primeiras etapas do crescimento, poderia influenciar no desempenho reprodutivo. CHEBEL et al. (2004) monitoraram o ET em vacas leiteiras entre 50 e 20 dias antes da inseminação artificial e observaram redução da taxa de concepção após exposição à temperaturas elevadas ($\geq 29^{\circ}\text{C}$) neste período.

LEROY et al. (2005, 2008a) observaram que condições de hipoglicemia, aliadas ao BEN, são refletidas no microambiente do ovócito pré-ovulatório, influenciando a taxa de maturação e os índices de fertilização, clivagem e formação de blastocistos. O tamanho e o número de folículos em crescimento são influenciados pela oscilação na ingestão de energia pré e pós-parto, com conseqüente diminuição das concentrações de IGF-I e aumento de AGNE no plasma (WALTERS et al., 2002b). Concentrações séricas e no fluido folicular de AGNE em vacas leiteiras apresentaram forte correlação positiva aos 33 ($r=0,84$) e 46 dias ($r=0,90$) pós-parto e associação com fluido folicular de folículos maiores que 10 mm ($r=0,50$) (LEROY et al., 2004a, 2004b). Os AGNE são um dos metabólitos mediadores dos efeitos inibitórios do BEN sobre a

fertilidade com efeito tóxico sobre o ovócito e células do cúmulus e da granulosa (LEROY et al., 2005). Estudo realizado por YUNG et al. (1996), *in vivo*, mostrou que o aumento da sua concentração foi relacionado com diminuição do peso do corpo lúteo e produção de progesterona.

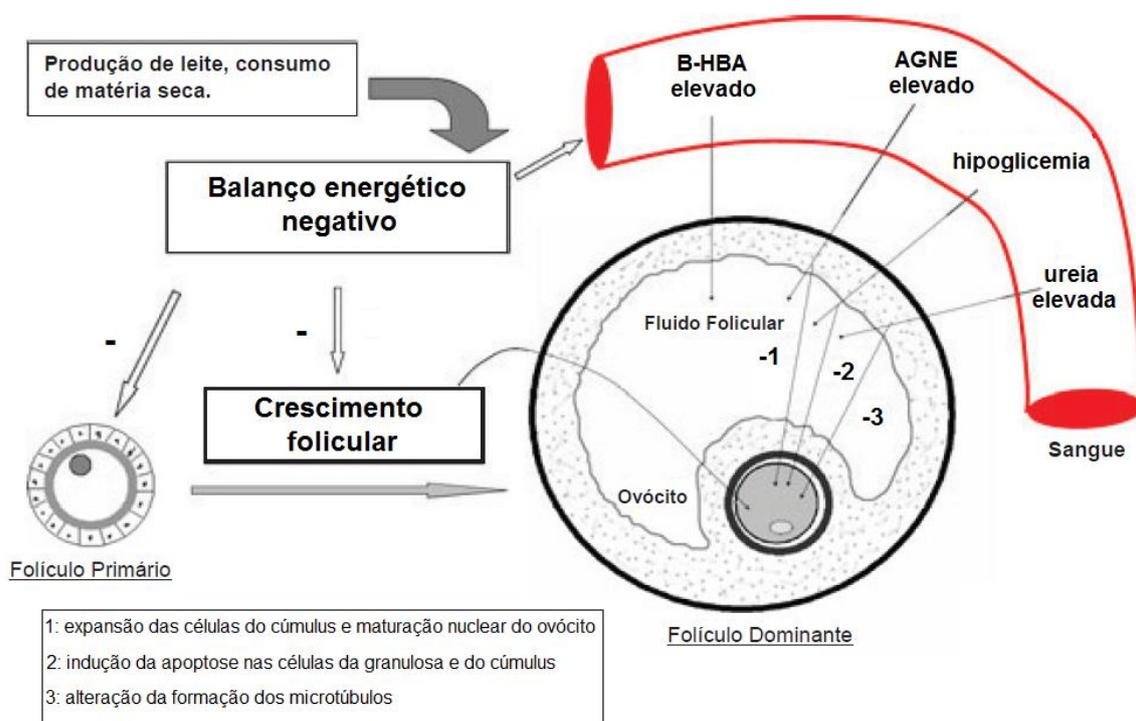


FIGURA 4 - Mecanismo metabólico correlacionando o balanço energético negativo e a qualidade do ovócito em vacas leiteiras de alta produção. B-HBA: betahidroxibutirato; AGNE: ácido graxo não esterificado; (-) inibição. Adaptado de LEROY et al. (2008b)

Durante a lactação as vacas mobilizam principalmente gordura corporal para produção de energia, no entanto, o aumento do metabolismo de aminoácidos para gliconeogênese ou o consumo de dieta rica em proteínas pode resultar em elevação da concentração de ureia plasmática, a partir da primeira semana pós-parto (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010). LEROY et al. (2004a) reportaram alta correlação ($r=0,95$) entre ureia sérica e folicular, sugerindo que altos níveis de ureia podem refletir no fluido folicular, comprometendo a qualidade do ovócito. JOZWIK et al. (2006) relataram o acúmulo de amônia no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de mulheres e que o transporte de ureia no

ambiente folicular seria realizado por difusão passiva, com nenhuma evidência de um ciclo ativo para a ureia nas células do folículo.

Os efeitos *in vitro* deste metabólito sobre as taxas de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário foram observados quando utilizado meios de cultivo com diferentes concentrações de ureia e níveis de acidez, sugerindo que dietas ricas em proteína altamente degradável podem comprometer a fertilidade por meio da ação direta sobre o ovócito ou pela redução do pH uterino (SINCLAIR et al., 2000; DE WIT et al., 2001; OCON & HANSEN, 2003). No entanto, outros estudos não observaram a influência da ureia sobre a fertilidade e pH uterino de vacas leiteiras (OLIVEIRA et al., 2004; REHAK et al., 2009) e a produção de embriões e taxas de concepção de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vivo* (BARRETO et al., 2003).

1.3 ESTRESSE TÉRMICO E FERTILIDADE

A redução da produtividade e fertilidade em vacas leiteiras está associada ao ET que ocorre durante o verão e períodos sazonais que apresentam temperatura ambiente (TA), umidade relativa (UR) e radiação solar acima do normal. Essa combinação de fatores ambientais aumenta o desconforto animal causando efeitos deletérios sobre a produção de leite, dinâmica folicular, qualidade do ovócito e embrião e taxas de concepção (CHEBEL et al., 2004; ROTH, 2008).

Para representar os efeitos combinados das variáveis temperatura ambiente e umidade relativa foi desenvolvido um índice de segurança denominado de ITU (índice de temperatura e umidade), com o propósito de monitorar as perdas relacionadas ao ET. Existem várias fórmulas desenvolvidas para calcular o ITU e de acordo com BOHMANOVA et al. (2007) elas diferem quanto à capacidade em determinar o ET e devem ser utilizadas conforme a região pesquisada. O ET, de acordo com a variação do ITU, pode ser classificado segundo ARMSTRONG (1994) em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98). Índices abaixo de 72 caracterizariam um ambiente sem estresse por calor. AZEVEDO et al. (2005) avaliaram diferentes grupos genéticos de Holandês (H) e Zebu (Z) e estimaram valores críticos superiores de ITU iguais a 80, 77 e 75 para as vacas em lactação dos grupos 1/2 HZ, 3/4 HZ e 7/8 HZ, respectivamente, observando que as vacas 1/2 HZ demonstraram maior tolerância ao calor.

A hipertermia pode comprometer a função ovariana provocando efeitos adversos na competência, dominância e esteroidogênese folicular, além de alterações na secreção de gonadotrofinas (ROTH et al., 2000). Ovócitos bovinos cultivados *in vitro* sob condições de ET originaram menores taxas de produção de embriões. Folículos pré-antrais primordiais e primários quando submetidos *in vitro* a temperaturas de 42°C, por 20 minutos, diminuíram o diâmetro folicular indicando alterações morfológicas que podem comprometer o seu desenvolvimento (ROTH & HANSEN, 2005; MUNHOZ & LUNA, 2008).

Ovócitos colhidos de vacas holandesas e fecundados *in vitro* durante o inverno apresentaram taxas superiores (29,9 ± 3,7%) de desenvolvimento a

blastocistos quando comparado àqueles colhidos no verão ($11,4 \pm 3,7\%$) (AL-KATANANI et al., 2002). Uma explicação para esse fenômeno pode estar relacionada à constituição lipídica da membrana do ovócito. ZERON et al. (2001) verificaram que durante o verão as células da granulosa e os ovócitos apresentaram maior quantidade de ácidos graxos saturados e no inverno maior quantidade de poliinsaturados. Estes resultados podem explicar as diferenças de viabilidade e competência do ovócito em desenvolver para o estágio de blastocisto em diferentes períodos do ano. Desta forma, mudanças na temperatura podem alterar as propriedades da membrana do ovócito que, por sua vez, pode influenciar os índices de fertilidade (Figura 5).

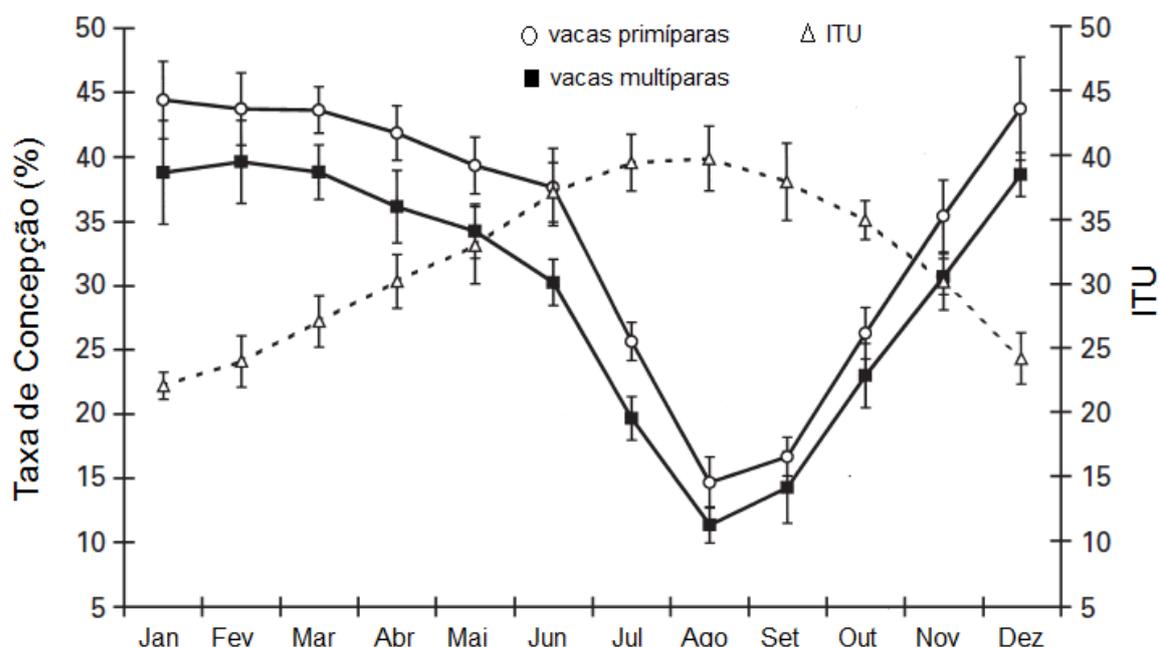


FIGURA 5 - Efeito da estação do ano sobre a taxa de concepção de vacas primíparas (o) e multíparas (■). Índice de temperatura e umidade (ITU: Δ). Adaptado de ZERON et al. (2001)

Além da estação do ano a categoria animal pode interferir na sensibilidade ao ET. CORASSIN et al. (2009) analisaram os fatores de risco associados a falhas de concepção ao primeiro serviço em vacas leiteiras de alta produção e observaram índice de prenhez inferior nas vacas multíparas quando comparadas às primíparas, o que pode ser justificado pela produção de calor

metabólico devido a maior produção de leite. Com relação à época do ano, as vacas que receberam o primeiro serviço pós-parto no inverno tiveram aproximadamente cinco vezes mais chance de concepção do que as cobertas no verão. SARTORI et al. (2002) compararam a taxa de fertilização e qualidade dos embriões entre vacas lactantes e novilhas, no verão, e entre vacas lactantes e vacas secas durante o inverno (Tabela 2). A qualidade dos embriões recolhidos das vacas em lactação foi inferior do que nas fêmeas não lactantes. Além disso, a taxa de fertilização foi reduzida apenas no verão, aparentemente devido ao ET sobre o ovócito.

TABELA 2 - Taxa de fertilização e qualidade de embriões de vacas Holandesas avaliadas em diferentes estações do ano

Estação	Categoria	Avaliação dos Embriões			Ovócitos (n)	Taxa de Fertilização (%)
		n	Qualidade*	Nº células		
Verão	Lactação	21	3,8 ± 0,4 ^a	19,3 ± 3,7 ^a	17	55,0 ^a
	Novilhas	32	2,2 ± 0,3 ^b	36,8 ± 3,0 ^b	-	100,0 ^b
Inverno	Lactação	36	3,1 ± 0,3 ^c	27,2 ± 2,7	5	87,8
	Seca	34	2,2 ± 0,3 ^d	30,6 ± 2,1	4	89,5

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna dentro da mesma estação; $p < 0,05$.

^{c,d}Letras diferentes na mesma coluna dentro da mesma estação; $p = 0,06$

*Qualidade do embrião: 1: excelente; 2: bom; 3: regular; 4: ruim; 5: degenerado.

Adaptado de SARTORI et al. (2002)

Com base nestas evidências, DEMETRIO et al. (2007) testaram a hipótese de que a transferência de embriões (TE) produzidos *in vivo* a partir de vacas não lactantes aumentaria a taxa de concepção (TC) de vacas leiteiras, devido a não exposição do embrião aos efeitos deletérios causados pela produção de leite e ET durante os primeiros sete dias após a inseminação artificial. Os resultados da TC após IA e TE (Tabela 3) demonstraram que a TE é uma importante ferramenta para o aumento da probabilidade de concepção em vacas da raça Holandesa, pois o embrião pode superar os reflexos negativos da

alta produção de leite, baixas concentrações de P₄ e aumento da temperatura corporal, principalmente quando utilizada em vacas de alta produção.

TABELA 3 - Taxas de concepção (TC) aos 28 e 42 dias em vacas detectadas em estro e que ovularam

Grupo	Vacas detectadas em estro		Vacas com ovulação	
	TC (%)	TC (%)	TC (%)	TC (%)
	28 dias	42 dias	28 dias	42 dias
Inseminação Artificial	32,6 (74/227)	29,1 (66/227)	37,9 (74/195)	33,8 (66/195)
Transferência de Embrião	49,4 (79/160)	38,8 (62/160)	59,4 (79/133)	46,6 (62/133)
Valor P	0,01	0,05	0,01	0,02

Adaptado de DEMETRIO et al. (2007)

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Gerais

Nas estações do verão e inverno:

Investigar os efeitos do estresse térmico e da perda de escore de condição corporal sobre o perfil metabólico sérico e do fluido folicular de vacas leiteiras durante o período pós-parto.

Monitorar a população folicular e a quantidade e qualidade dos ovócitos recuperados por aspiração em diferentes momentos pós-parto.

1.4.2 Específicos

Monitorar o perfil bioquímico sérico de vacas leiteiras no pós-parto mensurando os níveis séricos de glicose, colesterol total, triglicérides, ureia, sódio, potássio e cálcio.

Monitorar o perfil bioquímico do fluido folicular de folículos dominantes de vacas leiteiras no pós-parto quanto aos níveis de glicose, colesterol total, triglicérides, ureia, sódio, potássio e cálcio.

Investigar se as concentrações dos metabólitos no soro e fluido folicular de folículos dominantes são significativamente diferentes.

Avaliar se alterações metabólicas séricas são refletidas no fluido folicular do folículo dominante.

Pesquisar os efeitos da perda de escore de condição corporal e do estresse térmico sobre a população folicular e qualidade do ovócito.

1.5 REFERÊNCIAS

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**, Champaign, v.85, n.2, p.390-396, 2002.

ALVES, N.G.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, M.R.; ZAMPERLINI, B.; COSTA, F.M.J.; SANTOS, A.D.F.; NETO, T.M.; Atividade Ovariana em Fêmeas Bovinas da Raça Holandesa e Mestiças Holandês x Zebu, Durante Dois Ciclos Estrais Normais Consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.2, p.627-634, 2002.

ANTEBY, E.Y.; HURWITZ, A.; KORACH, O.; REVEL, A.; SIMON, A.; FINCI-YEHESKEL, Z.; MAYER, M.; LAUFER, N. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. **Human Reproduction**, Oxford, v.11, n.9, p.1947-1951, 1996.

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2044-2050, 1994.

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

BARRETO, A.G.; LOUVANDINI, H.; COSTA, C.P.; McMANUS, C.; RUMPF, R. Uso da Uréia como Suplemento Proteico na Dieta de Doadoras e Receptoras de Embriões Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.1, p.77-84, 2003.

BEN-SHLOMO, I.; ADASHI, E.Y.; PAYNE, D.W. The morphogenic/cytotoxic and prostaglandin-stimulating activities of interleukin-1 beta in the rat ovary are nitric

oxide independent. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.94, n.4, p.1463-1469, 1994.

BEKER-van WOUNDENBERG, A.R.; van TOL, HT.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality. **Biology of Reproduction**, Madison, v.70, n.5, p.1465-1474, 2004.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J.B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.4, p.1947-1956, 2007.

BRITT, J.H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Proceedings Annual Convention American Association Bovine Practitioners**, v.24, p.39-43, 1992.

BROWN, K.L.; CASSELL, B.G.; MCGILLIARD, M.L.; HANIGAN, M.D.; GWAZDAUSKAS, F.C. Hormones, metabolites, and reproduction in Holsteins, Jerseys, and their crosses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.2, p.698-707, 2012.

BUTLER, W.R.; SMITH, R.D. Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.3, p.767-83, 1989.

BUTLER, W.R. Review: Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.9, p.2533-2539, 1998.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v.127, n.5, p.537-545, 2004.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Energy Balance, Metabolic Status, and the First Postpartum Ovarian Follicle Wave in Cows Administered Propylene Glycol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.8, p.2938-2951, 2006.

CARATY, A.; FRANCESCHINI, I. Basic Aspects of the Control of GnRH and LH Secretions by Kisspeptin: Potential Applications for Better Control of Fertility in Females. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v.43, Suppl. 2, p.172-178, 2008.

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.; CERRI, R.I.; JUCHEM, S.O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.84, n.3-4, p.239-255, 2004.

COFFEY, M.P.; SIMM, G.; BROTHERSTONE, S. Energy balance profiles for the first three lactations of dairy cows estimated using random regression. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.10, p.2669-2678, 2002.

CORASSIN, C.H.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; SORIANO, S. Fatores de risco associados a falhas de concepção ao primeiro serviço em vacas leiteiras de alta produção. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.31, n.3, p.311-317, 2009.

COSTA, L.O.B.; MENDES, M.C.; FERRIANI, R.A.; MOURA, M.D.; REIS, R.M.; SILVA DE SÁ, M.F. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.37, n.11, p.1747-1755, 2004.

DEMETRIO, G.B.; SANTOS, R.M.; DEMETRIO, C.G.B.; VASCONCELOS, J.L.M. Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.11, p.5073-5082, 2007.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology**, New York, v.60, n.6, p.1139-1151, 2003.

DE WIT, A.A.C.; CESAR, M.L.F.; KRUIP, T.A.M. Effect of Urea During In Vitro Maturation on Nuclear Maturation and Embryo Development of Bovine Cumulus-Oocyte-Complexes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.8, p.1800-1804, 2001.

FRIGGENS, N.C.; RIDDER, C.; LOVENDAHL, P. On the Use of Milk Composition Measures to Predict the Energy Balance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.12, p.5453-5467, 2007.

GARNSWORTHY, P.C., JONES, G.P. The influence of body condition at calving and dietary protein supply on voluntary food intake and performance in dairy cows. **Animal Production**, Cambridge, v.44, n.3, p.347-353, 1987.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle Selection in Monovular Species. **Biology of Reproduction**, Madison, v.65, n.3, p.638-647, 2001.

GWAZDAUSKAS, F.C.; KENDRICK, K.W.; PRYOR, A.W.; BAILEY, T.L. Impact of Follicular Aspiration on Folliculogenesis as Influenced by Dietary Energy and Stage of Lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.7, p.1625-1634, 2000.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, New York, v.82-83, p.349-360, 2004.

HEINS, B.J.; HANSEN, L.B.; SEYKORA, A.J.; HAZEL, A.R.; JOHNSON, D.G.; LINN, J.G. Crossbreds of Jersey x Holstein Compared with Pure Holsteins for Body Weight, Body Condition Score, Dry Matter Intake, and Feed Efficiency During the First One Hundred Fifty Days of First Lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.9, p.3716-3722, 2008.

JONES, H.E.; WHITE, I.M.S.; BROTHERSTONE, S. Genetic evaluation of Holstein Friesian sires for daughter condition-score changes using a random regression model. **Animal Science**, Penicuik, v.68, n.3, p.467-475, 1999.

JÓZWIK, M.; JÓZWIK, M.; TENG, C.; BATTAGLIA, F.C. Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. **Human Reproduction**, Oxford, v.21, n.11, p.2776-2782, 2006.

KAWASHIMA, C.; FUKIHARA, S.; MAEDA, M.; KANEKO, E.; MONTOYA, C.A.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MATSUNAGA, N.; KIDA, K.; MIYAKE, Y.I.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v.133, n.1, p.155-163, 2007.

KENDRICK, K.W.; BAILEY, T.L.; GARST, A.S.; PRYOR, A.W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R.M.; EYESTONE, W.E.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of Energy Balance on Hormones, Ovarian Activity, and Recovered Oocytes in Lactating Holstein Cows Using Transvaginal Follicular Aspiration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1731-1740, 1999.

KIM, I.H.; SUH, G.H. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, New York, v.60, n.8, p.1445-1456, 2003.

KIM, J.Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, Seoul, v.39, n.1, p.10-14, 2012.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, New York, v.62, n.6, p.1131-1143, 2004a.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.80, n.3-4, p.201-211, 2004b.

LEROY J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, Cambridge, v.130, n.4, p.485-495, 2005.

LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; BOLS, P.E.J. The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality. **Animal**, Ghent, v.2, n.8, p.1120-1127, 2008a.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I - The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v.43, n.5, p.612-622, 2008b.

LIMA, F.S.; RISCO, C.A. THATCHER, M.J.; BENZAQUEN, M.E.; ARCHBALD, L.F.; SANTOS, J.E.; THATCHER, W.W. Comparison of reproductive performance in lactating dairy cows bred by natural service or timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.11, p.5456-5466, 2009.

LIMA, F.S.; DE VRIES, A.; RISCO, C.A.; SANTOS, J.E.; THATCHER, W.W. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, n.9, p.4404-4413, 2010.

LLEWELLYN, S.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D.A.; MURPHY, J.J.; SCARAMUZZI, R.J.; WATHES, D.C. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v.33, n.3, p.627-639, 2007.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1277-1293, 2001.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.81, n.2, p.301-307, 1987.

MAGALHÃES, D.M.; SALES, E.T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T.F.P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.32-38, 2012.

MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.3, p.1257-1266, 2012.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v.58, n.1, p.44-50, 2012.

MOORE, K.; THATCHER, W.W. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.4, p.1254-1266, 2006.

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 Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.2, n.3, p.85-88, 2008.

OCON, O.M.; HANSEN, P.J. Disruption of Bovine Oocytes and Preimplantation Embryos by Urea and Acidic pH. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.4, p.1194-1200, 2003.

OLIVEIRA, M.M.N.F.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P.; CARVALHO, G.R. Ureia para Vacas Leiteiras no Pós-Parto: Teor Plasmático de Ureia e pH Uterino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p.123-127, 2004.

OPSOMER, G.; GROHN, Y.T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, New York, v.53, n.4, p.841-857, 2000.

PALMA, G.A.; ARGANARAZ, M.E.; BARRERA, A.D.; RODLER, D.; MUTTO, A.A.; SINOWATZ, F. Biology and Biotechnology of Follicle Development. **The Scientific World Journal**, New York, doi:10.1100/2012/938138, 2012.

PANCARCI, S.M.; ARI, U.Ç.; ATAKISI, O.; GUNGOR, O.; CIGREMIS, Y.; BOLLWEIN, H. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 β progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.130, n.1-2, p.9-15, 2012.

PATTON, J.; KENNY, D.A.; McNAMARA, S.; MEE, J.F.; O'MARA, F.P.; DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J. Relationships Among Milk Production, Energy Balance, Plasma Analytes, and Reproduction in Holstein-Friesian Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.2, 649-658, 2007.

POWERS, R.W., CHEN, L.; RUSSEL, P.T.; LARSEN, W.J.; Gonadotropin-stimulated regulation of blood-follicle barrier is mediated by nitric oxide. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.269, n.2, E290-E298, 1995.

PUSHPAKUMARA, P.G.; GARDNER, N.H.; REYNOLDS, C.K.; BEEVER, D.E.; WATHES, D.C. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**, New York, v.60, n.6, p.1165-1185, 2003.

REHAK, D.; RAJMON, R.; KUBESOVA, M.; STIPKOVA, M.; VOLEK, J.; JILEK, F. Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. **Czech Journal of Animal Science**, Praha, v.54, p.193-200, 2009.

RENAVILLE, B.; BACCIU, N.; COMIN, A.; MOTTA, M.; POLI, I.; VANINI, G.; PRANDI, A. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v.45, n.1, p.118-121, 2010.

REVAH, I.; BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.106, n.1, p.39-47, 1996.

ROCHE, J.R.; FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.12, p.5769-57801, 2009.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.120, n.1, p.83-90, 2000.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, Cambridge, v.129, n.2, 235-244, 2005.

ROTH, Z. Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v.43, Suppl. 2, p.238-244, 2008.

ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, New York, v.69, n.8, p.932-939, 2008.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 β in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.11, p.2831-2842, 2002.

SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, J.L.M. Ingestão de concentrado e concentração plasmática de progesterona em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.6, p.1162-1167, 2006.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.11, p.2803-2812, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.4, p.905-920, 2004.

SHEHAB-EL-DEEN, M.A.M.M.; LEROY, J.L.M.R.; FADEL, M.S.; SALEH, S.Y.A.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early postpartum. **Animal Reproduction Science**, New York, v.117, n.3-4, p.189-200, 2010.

SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; WEBB, R.; McEVOY, T.G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.78, n.10, p.2670-2680, 2000.

TAYLOR, V.J.; BEEVER, D.E.; BRYANT, M.J.; WATHES, D.C. Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. **Theriogenology**, New York, v.59, n.7, p.1661-1677, 2003.

VEERKAMP, R.F. Selection for Economic Efficiency of Dairy Cattle Using Information on Live Weight and Feed Intake: A Review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.4, p.1109-1119, 1998.

VEERKAMP, R.F.; KOENEN, E.P.; DE JONG, G. Genetic Correlations Among Body Condition Score, Yield, and Fertility in First-Parity Cows Estimated by Random Regression Models. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.10, p.2327-2335, 2001.

WALTERS, A.H.; PRYOR, A.W.; BAILEY, T.L.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid lactation Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v.57, n.2, p.949-961, 2002a.

WALTERS, A.H.; BAILEY, T.L.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.4, p.824-832, 2002b.

WEIGEL, K.A.; BARLASS, K.A. Results of a producer survey regarding crossbreeding on US dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.12, p.4148-4154, 2003.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, New York, v.60-61, p.535-547, 2000.

YUNG, M.C.; VANDEHAAR, M.J.; FOGWELL, R.L.; SHARMA, B.K. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers, **Journal of Animal Science**, Columbia, v.74, n.9, p.2239-2244, 1996.

YUSUF, M.; NAKAO, T.; YOSHIDA, C.; LONG, S.T.; GAUTAM, G.; RANASINGHE, R.M.; KOIKE, K.; HAYASHI, A. Days in milk at first AI in dairy cows; its effect on subsequent reproductive performance and some factors influencing it. **Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v.57, n.5, p.643-649, 2011.

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

CAPÍTULO 2 - Perfil metabólico sérico e do fluido folicular de vacas Girolando (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) no pós-parto, durante o verão e inverno

RESUMO

Esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de monitorar o perfil bioquímico sérico e do fluido folicular de vacas leiteiras durante os primeiros 90 dias pós-parto, nas estações do verão (n=30) e inverno (n=30). Amostras de sangue e de fluido folicular (FF, folículos ≥ 9 mm) de vacas Girolando foram obtidas nos dias 30, 45, 60, 75 e 90 do pós-parto e utilizadas para mensuração das concentrações de glicose, colesterol total (CT), triglicérides (TG), ureia, sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca). As variáveis clínicas temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR) e escore de condição corporal (ECC) foram mensuradas e para cada estação foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU). No verão o ITU foi superior, ocorreu maior perda de ECC e aumento da TR, assim como redução nas concentrações séricas de glicose, Na e K em relação ao inverno. Correlações positivas ($P < 0,05$) foram observadas entre as concentrações séricas e no FF para glicose ($r=0,11$), CT ($r=0,18$) e Ca ($r=0,30$). A concentração de Ca no FF apresentou associação positiva com glicose ($r=0,23$), CT ($r=0,31$), TG ($r=0,12$), ureia ($r=0,13$), Na ($r=0,43$) e K ($r=0,36$). Concluindo, os efeitos do BEN em conjunto com o estresse térmico aumentam a perda de ECC e diminuem as concentrações séricas de glicose, Na e K. Alterações nas concentrações de glicose, CT e Ca sérico são refletidas no FF, os quais podem comprometer a competência ovocitária.

Palavras-chave: fluido folicular; eletrólitos; balanço energético; estresse térmico; vaca leiteira

CHAPTER 2 - Metabolic profile of serum and follicular fluid from Girolando cows (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) on postpartum period during summer and winter

ABSTRACT

The current study aimed to monitor the biochemical profiles of serum and follicular fluids (FF) of postpartum dairy cows during the summer (n=30) and winter (n=30). Blood and FF (follicles ≥ 9 mm) were obtained from Girolando cows at 30, 45, 60, 75, and 90 days postpartum. The samples were used to determine glucose, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), urea, sodium (Na), potassium (K), and calcium (Ca) levels. Clinical variables were measured; including rectal temperature (RT), respiratory rate (RR), and body condition score (BCS). In addition, the temperature humidity index (THI) of cows was calculated. During summer THI and BCS loss were higher with RT increase, even as the reduction on glucose, Na and K serum concentrations related to winter. Positive correlations ($P < 0.05$) were observed between the serum and FF levels and glucose ($r=0.11$), TC ($r=0.18$), and Ca ($r=0.30$). Further, a positive correlation was obtained between follicular Ca levels and glucose ($r=0.23$), TC ($r=0.31$), TG ($r=0.12$), urea ($r=0.13$), Na ($r=0.43$), and K ($r=0.36$). Therefore, the HS associated with NEB during summer caused increased loss of BCS and reduced glucose, Na, and K serum levels. Additionally, the changes in glucose, TC, and Ca serum levels were reflected in the FF levels, which may compromise oocyte competence.

Key words: follicular fluid; electrolytes; energy balance; heat stress; dairy cattle

2 INTRODUÇÃO

Alterações bioquímicas ocorridas durante a lactação podem comprometer o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras? Esta questão impulsionou a realização de vários estudos relacionados ao metabolismo e fisiologia reprodutiva de rebanhos leiteiros (BELYEA et al., 1978; VILLA-GODOY, 1988; WILSON et al., 1998; LUCY, 2001; COZZI et al., 2011).

O declínio da eficiência reprodutiva no período pós-parto pode ser causado por diversos fatores como produção de leite (HANSEN, 2000), nutrição (CHAPA et al., 2001), balanço energético (KENDRICK et al., 1999) e estresse térmico (ET) (DOBSON & SMITH, 2000), os quais, associados ou não, contribuem de forma significativa para a ocorrência de distúrbios endócrinos, baixas concentrações de esteroides, falhas na ovulação, produção de gametas e embriões de qualidade inferior e decréscimo das taxas de concepção (SARTORI et al., 2004). VILLA-MANCERA et al. (2011) observaram os efeitos deletérios das variáveis climáticas temperatura ambiente, umidade relativa do ar, índice de temperatura e umidade, velocidade do vento e pluviosidade, dois dias antes da inseminação artificial, sobre a taxa de concepção de vacas Holandesas criadas em clima tropical sob sistema intensivo.

A composição bioquímica do fluido folicular, que deriva principalmente do plasma e de fatores produzidos localmente por células foliculares, reflete as diferentes condições reprodutivas e processos fisiológicos ou patológicos do plasma (FAHIMINIYA & GÉRARD, 2010). Uma forma de monitorar essas alterações bioquímicas e seu efeito sobre o microambiente no qual o complexo cumulus-ovócito se desenvolve é a utilização da aspiração folicular transvaginal (AFT). Com uso desta biotécnica, alguns estudos evidenciaram o efeito negativo da lactação sobre a morfologia dos ovócitos e produção de hormônios (GWAZDAUSKAS et al., 2000; WALTERS et al., 2002), entretanto, outros estudos não observaram diferenças na qualidade do ovócito e desenvolvimento embrionário de vacas sob estresse metabólico (MATOBA et al., 2012), ou na produção *in vitro* de embriões, comparando vacas lactantes e novilhas (RIZOS et al., 2005).

Na literatura especializada são vários os artigos reportando alterações metabólicas e hormonais tanto no soro sanguíneo quanto no ambiente folicular de vacas Holandesas criadas sob condições intensivas de manejo. Entretanto, para a raça Girolando (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) e suas variações, que compreendem 70% das vacas leiteiras no Brasil (SILVA et al., 2011), essas alterações são desconhecidas.

No Brasil, grande parte da produção leiteira provém da região do cerrado - 30% da produção nacional. Nesse bioma, a criação de animais de raças compostas, tais como a Girolando é favorecida por sua maior capacidade de adaptação às condições ambientais e pela possibilidade de manutenção de sistema de pastoreio associado à suplementação alimentar. Devido a intensidade de seleção, a produção de leite de vacas Girolando dobrou nas últimas décadas (8,29 Kg/dia para 16,0 Kg/dia; 62534 lactações avaliadas) (ABCG, 2011). O desconhecimento dessas inter-relações fisiológicas reduz, portanto, a qualidade na avaliação do real potencial reprodutivo dessas vacas, em especial nas condições de criação presentes no cerrado. Assim, em razão do grande interesse em torno dos temas produção de leite, perfil metabólico, balanço energético negativo (BEN) e estresse térmico, esse estudo foi delineado com a proposta de monitorar as mudanças bioquímicas séricas e do fluido folicular de folículos dominantes de vacas Girolando, estabelecendo a inter-relação dessas alterações com o período pós-parto e estação do ano.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Animais e local

Vacas da raça Girolando foram acompanhadas durante o inverno (n=30) e verão (n=30), no período entre julho de 2011 e fevereiro de 2012, em uma fazenda experimental localizada em região de cerrado, latitude 18° 55' 08" sul e longitude 48° 16' 37" oeste, 776 m acima do nível do mar, com clima tropical de altitude, tipo CWA segundo Köppen (RUBEL & KOTTEK, 2010), temperatura média anual de 22°C, variando de 23,9°C no verão a 19,3°C no inverno. Todas as vacas estavam na terceira ordem de parto com produção média de leite de 19,0 ± 0,6 kg (verão) e 20,0 ± 0,5 kg (inverno). As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia e manejadas em sistema a pasto, com suplementação durante o verão e confinamento com fornecimento de dieta total (mineral, concentrado e volumoso) no inverno, formulada (Tabela 1) de acordo com as exigências nutricionais de produção (NRC, 2001). A média de produção de leite do rebanho por lactação (305 dias) era 5947,5 kg e o peso médio das vacas antes do parto foi de 565 ± 13,2 kg no verão e 540 ± 11,8 Kg no inverno.

TABELA 1 - Composição percentual (% MS) dos ingredientes e análise bromatológica das dietas utilizadas durante as estações do verão e inverno

Ingredientes (% MS)	Estação	
	Verão	Inverno
<i>Cynodon spp. cv. Tifton 85</i>	71,5	-
Silagem de Sorgo	-	69,1
Concentrado 24% de PB	27,1	29,6
Núcleo Mineral	1,4	1,3
Composição bromatológica da dieta total		
NDT (% MS)	62,0	65,0
PB, (% MS)	15,1	13,9
FDA, (% MS)	23,7	26,2
FDN, (% MS)	41,5	40,7
EM, (Mcal/kg MS)	2,3	2,4
EL, (Mcal/kg MS)	1,4	1,5
Extrato Etéreo, (% MS)	2,6	2,2
Ca, (% MS)	1,3	1,2
P, (% MS)	0,6	0,4

MS: matéria seca; NDT: nutrientes digestíveis totais; PB: proteína bruta; FDA: fibra detergente ácida; FDN: fibra detergente neutra; EM: energia metabolizável; EL: energia líquida; Ca: cálcio; P: fósforo.

2.1.2 Variáveis clínicas e meteorológicas

Antes das aspirações foliculares as variáveis fisiológicas temperatura retal (TR), frequência respiratória (FR), peso corporal e escore de condição corporal (ECC: 1 magra e 5 gorda), com variações de 0,25 pontos (EDMONSON et al., 1989), eram avaliadas.

Os dados relativos à temperatura ambiente (TA, °C) e umidade relativa do ar (UR, %) foram obtidos da estação meteorológica do Laboratório de Climatologia da Universidade Federal de Uberlândia, localizada a 2 km da

fazenda experimental, e utilizados para calcular o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com a equação proposta por MADER et al. (2006):

$$\text{ITU} = [0,8 \times \text{TA}] + [(\text{UR} \div 100) \times (\text{TA} - 14,4) + 46,4]$$

2.1.3 Aspiração transvaginal folicular guiada por ultrassonografia

No intervalo entre a primeira e segunda ordenhas, para cada estação do ano (inverno e verão), nos dias 30, 45, 60, 75 e 90 após o parto as vacas selecionadas eram submetidas à punção dos folículos com diâmetro ≥ 9 mm, por meio do procedimento de aspiração folicular transvaginal. Para isso, utilizou-se equipamento de ultrassom (SSD-500 Aloka[®]) com transdutor microconvexo de 5 MHz, acoplado à guia de biópsia (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada[®]) e linha de aspiração (WTA[®]) com cateter 16G x 5,25 pol (1,7 mm x 133 mm; Angiocath BD[®]).

Após higienização do períneo e aplicação da anestesia epidural (4 mL de lidocaína a 2%; Pearson, Eurofarma[®]), para diminuição dos movimentos peristálticos e desconforto, a guia de aspiração foi inserida na vagina e, após o posicionamento dos ovários para mensuração e identificação dos folículos com diâmetro ≥ 9 mm, o fluido folicular foi aspirado com auxílio de uma seringa de 5 mL (Descarpack[®]) acoplada à linha de aspiração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2100 x g; 30 min) e o sobrenadante armazenado a -20°C para posterior análise bioquímica. Somente amostras de fluido folicular livres de contaminação com sangue foram utilizadas.

2.1.4 Obtenção das amostras de soro sanguíneo

As amostras de sangue foram obtidas antes das sessões de aspiração folicular. A veia coccígea foi puncionada com agulha 4,0 cm x 1,2 mm (BD[®]) e o sangue (10 mL) armazenado em tubos a vácuo estéreis. Em seguida, as amostras foram enviadas ao laboratório em caixa isotérmica a 4°C, centrifugadas

(2100 x g; 30 min) e o soro obtido aliqotado em amostras de 1,5 mL em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise bioquímica.

2.1.5 Análise bioquímica do soro sanguíneo e fluido folicular

Para cada amostra de soro e fluido folicular foram determinadas as concentrações de glicose, colesterol total (CT), triglicérides (TG), ureia, sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca). As análises bioquímicas de glicose (sérica e folicular) foram realizadas imediatamente após a obtenção das amostras por meio de tiras reagentes em sistema previamente validado no laboratório (Accu-Chek Active[®]; Roche Diagnostics[®]). As concentrações de colesterol total e triglicérides foram determinadas por reação enzimática de ponto final, utilizando conjuntos comerciais (Colesterol Liquiform[®] e Triglicérides Liquiform[®]; Labtest Diagnostica[®]). As concentrações de ureia foram calculadas por reação enzimática e fotometria ultravioleta, usando cinética de dois pontos (Ureia UV Liquiform[®]; Labtest Diagnostica[®]). As dosagens dos íons sódio, potássio e cálcio foram determinadas pelo método de eletrodo íon-seletivo, utilizando o analisador eletrolítico AVL 9180 (Roche Diagnostics[®]). As análises de colesterol total, triglicérides e ureia foram executadas no analisador bioquímico semiautomático Bio-2000 BIOPLUS[®] (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda.). Todas as análises realizadas seguiram os procedimentos sugeridos pelos fabricantes e os coeficientes de variação intraensaio e inter-ensaio foram menores que 5%.

2.1.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5. As análises de crítica e consistência dos dados foram realizadas por meio do procedimento UNIVARIATE (SAS, 2000) para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância. Análises de variância foram realizadas utilizando-se o método dos quadrados mínimos por meio do

procedimento GLM e as médias ajustadas obtidas através da opção LSMEANS do PROC GLM. O seguinte modelo foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + Tr_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : observação do animal j, pertencente ao i-ésimo tratamento;

μ : média geral da variável dependente em estudo;

Tr_i : efeito fixo do i-ésimo tratamento;

e_{ij} : erro aleatório associado a cada observação ij, pressuposto normalmente distribuído e independente com média zero e variância σ^2 .

O teste de média “t” foi obtido por meio da opção LSMEANS PROC GLM. A avaliação da intensidade de associação entre duas variáveis foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson obtido pelo procedimento CORR (SAS, 2000). Coeficientes de correlação de Pearson (r) foram classificados como forte ($r > 0,6$), moderado (r entre 0,6 e 0,4) e fraco ($r < 0,4$). Os valores reportados estão expressos na forma de média ajustada pelos quadrados mínimos e erro padrão da média (epm). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

2.2 RESULTADOS

A média do ITU calculado foi superior durante o verão ($71,0 \pm 0,04$ vs. $67,9 \pm 0,1$; $P < 0,01$), assim como a temperatura ambiente ($23,8 \pm 0,1$ vs. $22,9 \pm 0,1$; $P < 0,01$) (Figuras 1ab). Em relação às variáveis fisiológicas, a temperatura retal mostrou diferença ($P < 0,01$) entre as estações, sendo $38,5^{\circ}\text{C}$ no verão e $38,2^{\circ}\text{C}$ no inverno, mas a frequência respiratória (mov/min) verificada foi semelhante ($P > 0,05$) entre verão ($35,1 \pm 0,5$) e inverno ($35,6 \pm 0,8$). A perda de escore de condição corporal do parto até 90 dias de lactação ($P < 0,01$), em pontos, ocorreu tanto no verão ($0,89 \pm 0,04$) quanto no inverno ($0,39 \pm 0,02$), caracterizando a condição de balanço energético negativo, sendo que no verão não houve recuperação ($P > 0,05$) da condição corporal no período avaliado, ao contrário do inverno ($P < 0,01$) (Figura 2).

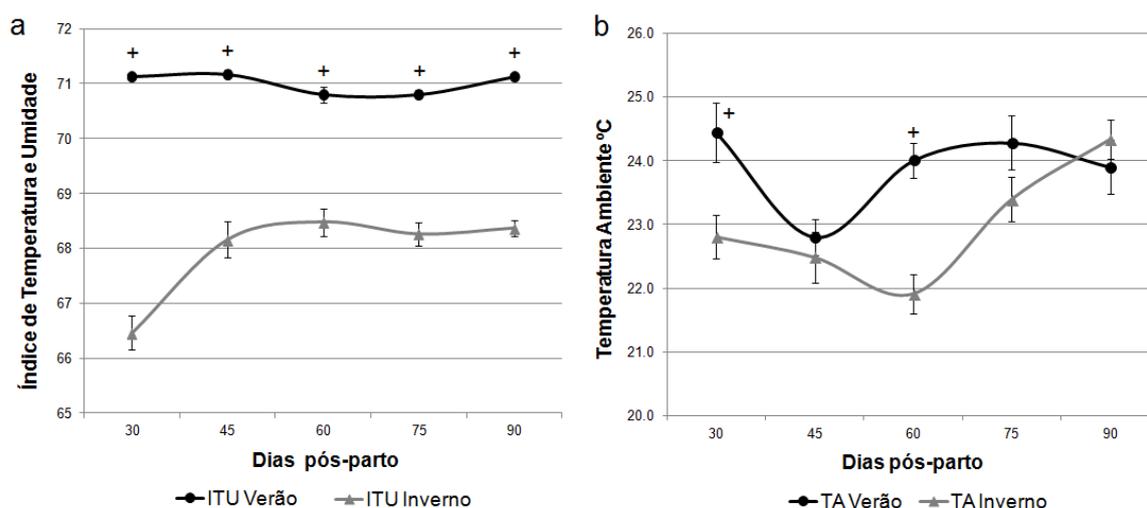


FIGURA 1 - Média \pm (epm) das variáveis climáticas: (a) índice de temperatura e umidade (ITU) e (b) temperatura ambiente (TA), durante as aspirações foliculares ocorridas nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para ITU e TA (⁺ $P < 0,01$).

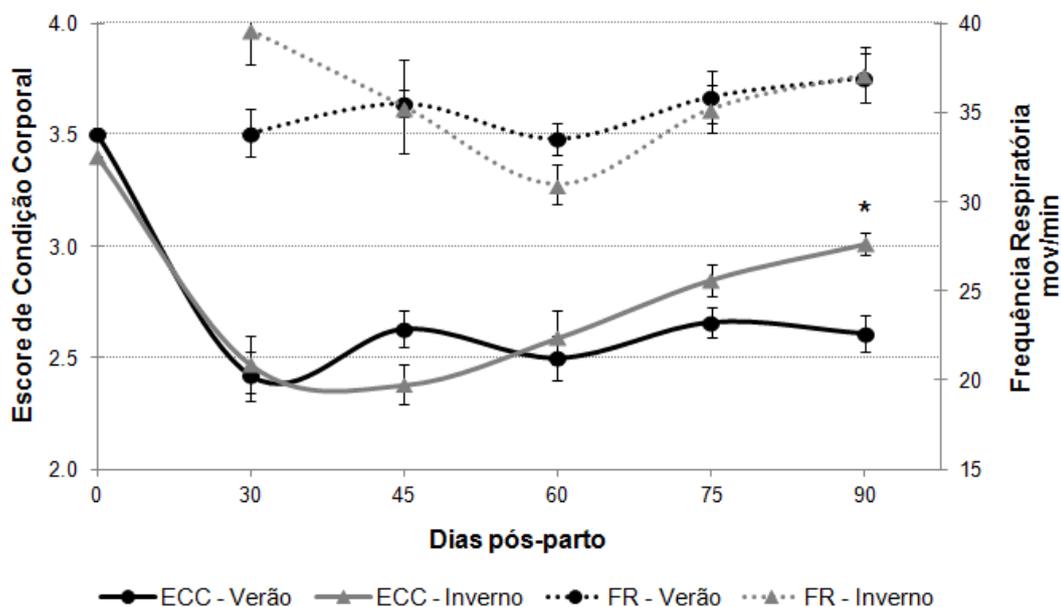


FIGURA 2 - Média \pm (epm) do escore de condição corporal (ECC) e frequência respiratória (FR) de vacas leiteiras avaliadas durante o pós-parto no verão e inverno. Diferença significativa entre estações para ECC (* $P < 0,01$).

As concentrações de glicose sérica foram maiores no inverno ($63,5 \pm 0,9$ mg/dL) ($P < 0,01$) que no verão ($56,1 \pm 0,7$ mg/dL). Em ambas estações, essas concentrações decresceram gradativamente ($P < 0,05$) a partir de 45 dias pós-parto. As concentrações de glicose no fluido folicular foram maiores que no soro ($76,6 \pm 1,7$ vs. $59,8 \pm 0,6$ mg/dL; $P < 0,01$), mas semelhantes ($P > 0,05$) entre inverno ($77,1 \pm 1,9$) e verão ($76,1 \pm 2,8$) (Figura 3), verificando-se correlação positiva entre as concentrações séricas e foliculares ($r = 0,11$; $P < 0,05$).

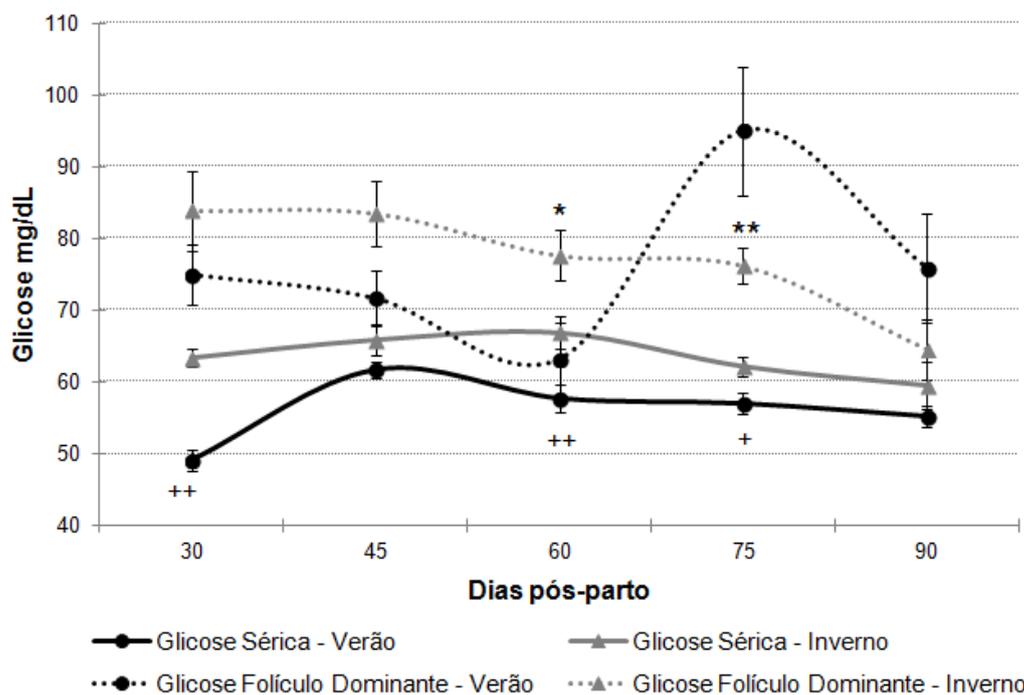


FIGURA 3 - Concentração média \pm (epm) de glicose (mg/dL) no soro e fluido folicular (foliculo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) e no fluido folicular (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

As concentrações de colesterol sérico não diferiram entre verão ($136,9 \pm 7,7$ mg/dL) e inverno ($129,2 \pm 4,2$ mg/dL), aumentando significativamente em ambas as estações ($P < 0,05$) após 45 dias de lactação. Considerando as duas estações a concentração de colesterol sérico ($133,1 \pm 3,2$ mg/dL) foi superior ($P < 0,01$) à folicular ($72,0 \pm 2,7$ mg/dL). Na comparação entre estações, as concentrações foliculares foram significativamente maiores no verão ($83,3 \pm 4,4$ mg/dL vs. $60,7 \pm 3,1$ mg/dL; $P < 0,01$). Dentro de cada estação verificou-se que, entre 30 e 90 dias, as concentrações de colesterol sérico aumentaram 31% no verão e 38% no inverno (Figura 4). Houve associação positiva entre as concentrações séricas e foliculares, em ambas as estações ($r = 0,18$; $P < 0,01$).

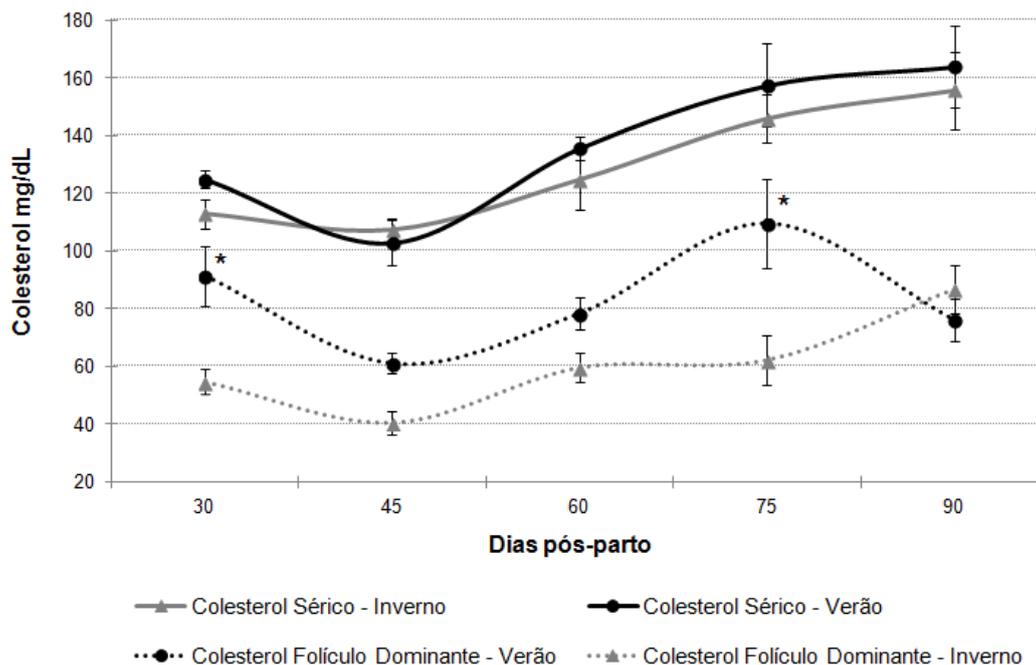


FIGURA 4 - Concentração média \pm (epm) de colesterol total (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante \geq 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração no fluido folicular (* $P < 0,01$).

Com relação aos triglicérides as concentrações séricas ($13,3 \pm 0,7$ vs. $11,3 \pm 0,7$ mg/dL; $P < 0,05$) e foliculares ($22,1 \pm 1,9$ vs. $14,3 \pm 1,0$ mg/dL; $P < 0,01$) foram maiores no verão, com decréscimo de 65% no verão e 69% no inverno no período entre 30 e 90 dias pós-parto. Em média, considerando as duas estações, as concentrações foliculares foram significativamente superiores ($P < 0,01$) às séricas ($18,2 \pm 1,1$ vs. $12,3 \pm 0,5$ mg/dL) (Figura 5).

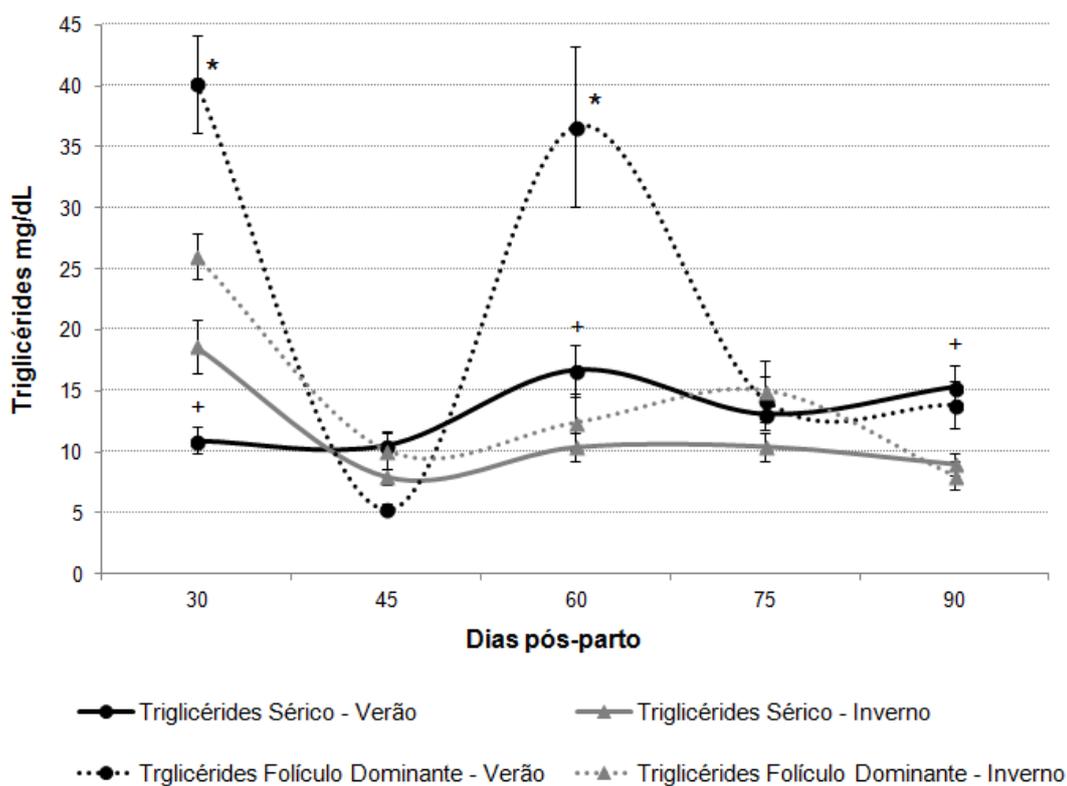


FIGURA 5 - Concentração média \pm (epm) de triglicérides (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante ≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica ($^+P < 0,01$) e no fluido folicular ($^*P < 0,01$).

As concentrações de ureia sérica foram superiores ($P < 0,01$) no inverno em relação ao verão ($31,3 \pm 1,5$ vs. $23,6 \pm 0,9$ mg/dL), com decréscimo significativo a partir de 30 dias de lactação, nas duas estações. As concentrações de uréia no fluido folicular foram significativamente maiores durante o verão ($13,3 \pm 0,7$ vs. $11,2 \pm 0,6$ mg/dL), com maior elevação 45 dias após o parto. Durante o inverno ocorreu diminuição nessas concentrações já a partir do dia 30 pós-parto. Em ambas as estações as concentrações séricas ($27,5 \pm 0,9$ mg/dL) foram superiores ($P < 0,01$) às foliculares ($12,3 \pm 0,4$ mg/dL) (Figura 6).

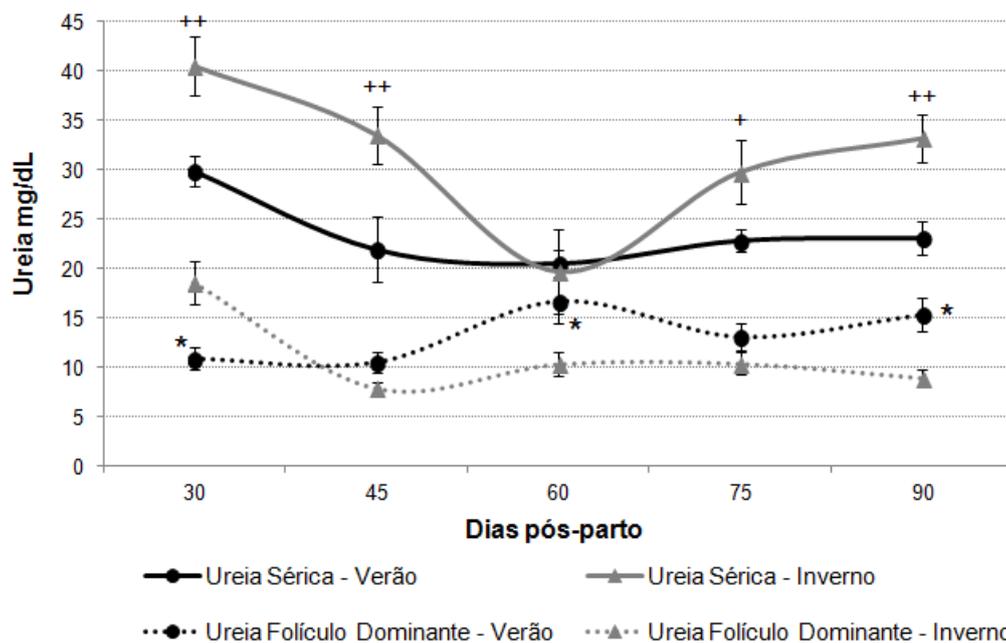


FIGURA 6 - Concentração média \pm (epm) de ureia (mg/dL) no soro e fluido folicular (folículo dominante ≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) e no fluido folicular (* $P < 0,01$).

As concentrações médias de sódio sérico foram maiores ($P < 0,05$) no inverno ($139,2 \pm 2,1$ vs. $134,4 \pm 1,5$ mmol/L), com variações muito significativas ($P < 0,01$) no dia 60 pós-parto. As concentrações foliculares de sódio foram semelhantes ($P > 0,05$) no verão ($221,5 \pm 9,8$ mmol/L) e inverno ($206,6 \pm 5,9$ mmol/L). Entre as estações, diferenças significativas no fluido folicular foram verificadas aos 30 e 75 dias pós-parto (Figura 7). As concentrações foliculares ($214,0 \pm 5,7$ mmol/L) foram superiores ($P < 0,01$) às séricas ($136,8 \pm 1,3$ mmol/L).

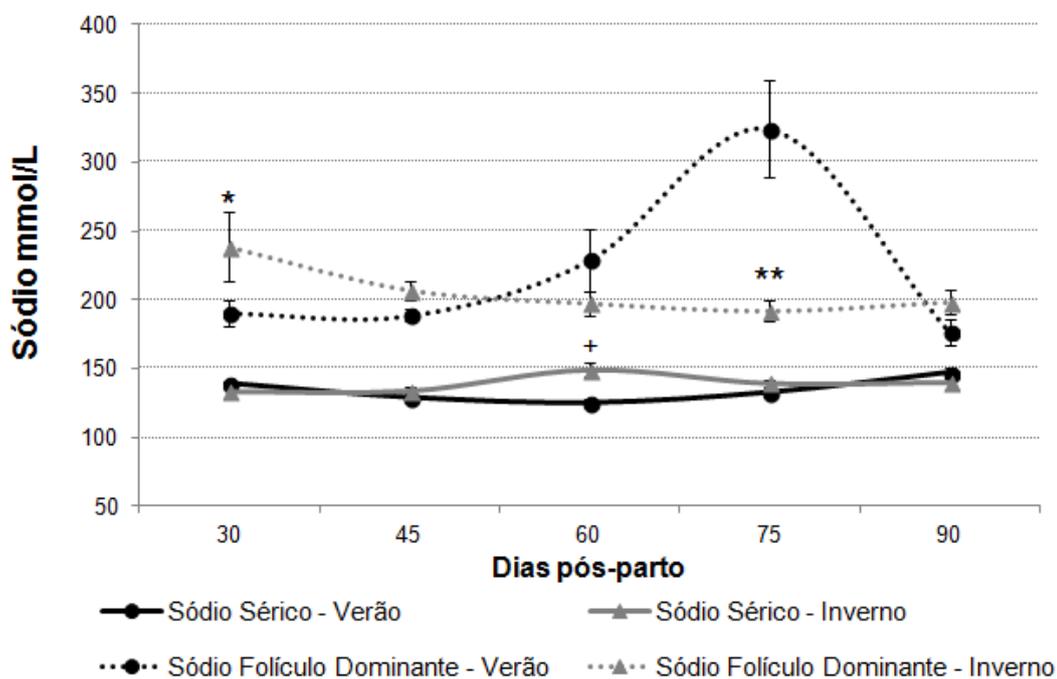


FIGURA 7 - Concentração média \pm (epm) de sódio (mmol/L) no soro e fluido folicular (foliculo dominante ≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica ($^+P < 0,01$) e no fluido folicular ($^*P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$).

Em relação ao potássio, as concentrações séricas foram significativamente maiores ($P < 0,01$) no inverno ($4,8 \pm 0,1$ vs. $4,3 \pm 0,1$ mmol/L), atingindo o máximo valor aos 60 dias pós-parto, tanto no inverno ($5,4 \pm 0,2$ mmol/L) quanto no verão ($4,7 \pm 0,3$ mmol/L). No verão as concentrações de potássio no fluido folicular foram superiores às do inverno ($4,7 \pm 0,2$ vs. $4,3 \pm 0,1$ mmol/L; $P < 0,01$), com elevação aos 60 e 75 dias pós-parto (Figura 8).

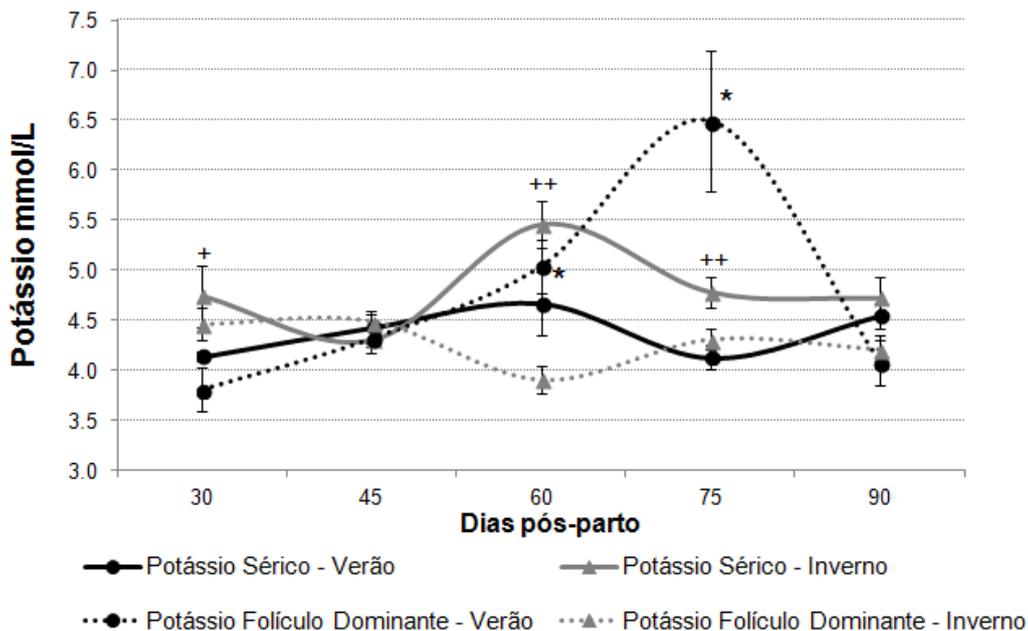


FIGURA 8 - Concentração média \pm (epm) de potássio (mmol/L) no soro e fluido folicular (folículo dominante ≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica ($^+P < 0,05$; $^{++}P < 0,01$) e no fluido folicular ($^*P < 0,01$).

As concentrações de cálcio sérico (verão, $0,8 \pm 0,01$; inverno, $0,6 \pm 0,01$ mmol/L) e folicular (verão, $0,9 \pm 0,1$; inverno, $0,5 \pm 0,02$ mmol/L) diferiram ($P < 0,01$) em todos os momentos avaliados, com exceção para o fluido folicular no trigésimo dia pós-parto. Entre 30 e 90 dias de lactação as concentrações séricas apresentaram poucas variações, mas as concentrações foliculares decresceram acentuadamente em ambas estações, com maior redução no verão (42% vs. 34%, $P < 0,01$). Na comparação das concentrações médias de cálcio, sem considerar a estação do ano, não houve diferença entre soro ($0,7 \pm 0,01$ mmol/L) e fluido folicular ($0,8 \pm 0,02$ mmol/L), mas houve correlação positiva entre elas ($r = 0,30$; $P < 0,01$) (Figura 9).

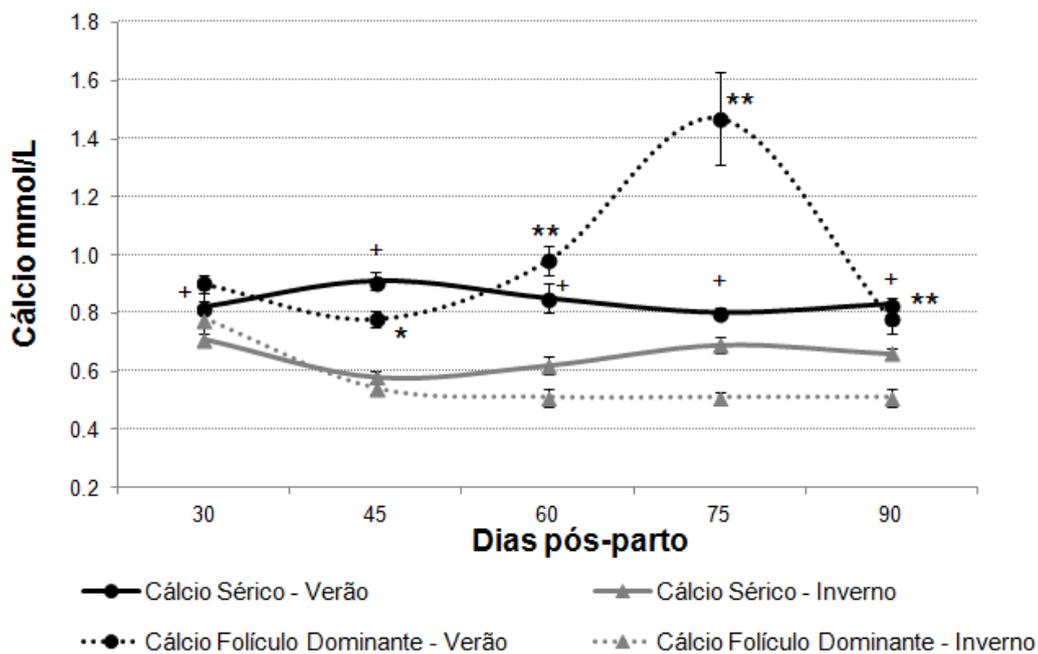


FIGURA 9 - Concentração média \pm (epm) de cálcio (mmol/L) no soro e fluido folicular (foliculo dominante ≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto nas estações do verão e inverno. Diferença significativa entre estações para concentração sérica ($^+P < 0,01$) e no fluido folicular ($^*P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$).

Os coeficientes de correlação determinados para as concentrações de glicose, colesterol total, triglicérides, ureia, sódio, potássio e cálcio no fluido folicular estão apresentados na Tabela 2 e a relação entre produção de leite, concentrações séricas de glicose e triglicérides e perda de escore de condição corporal estão sumariados na figura 10.

TABELA 2 - Coeficientes de correlação (r) entre metabólitos e eletrólitos no fluido folicular de folículos dominantes (≥ 9 mm) de vacas leiteiras durante o pós-parto

Coeficientes de Correlação (r)							
Metabólitos no Fluido Folicular							
	Glicose	CT	TG	Ureia	Na	K	Ca
Glicose		0,23**	Ns	Ns	0,21**	0,17**	0,23**
CT	0,23**		0,18**	Ns	0,25**	0,22**	0,31**
TG	Ns	0,18**		Ns	Ns	0,12*	0,12*
Ureia	Ns	Ns	Ns		Ns	Ns	0,13*
Na	0,21**	0,25**	Ns	Ns		0,46**	0,43**
K	0,17**	0,22**	0,12*	Ns	0,46**		0,36**
Ca	0,23**	0,31**	0,12*	0,13*	0,43**	0,36**	

Ns: Não significativa; CT: colesterol total; TG: triglicérides; Na: sódio; K: potássio; Ca: cálcio. Valores numéricos com correlações significantes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

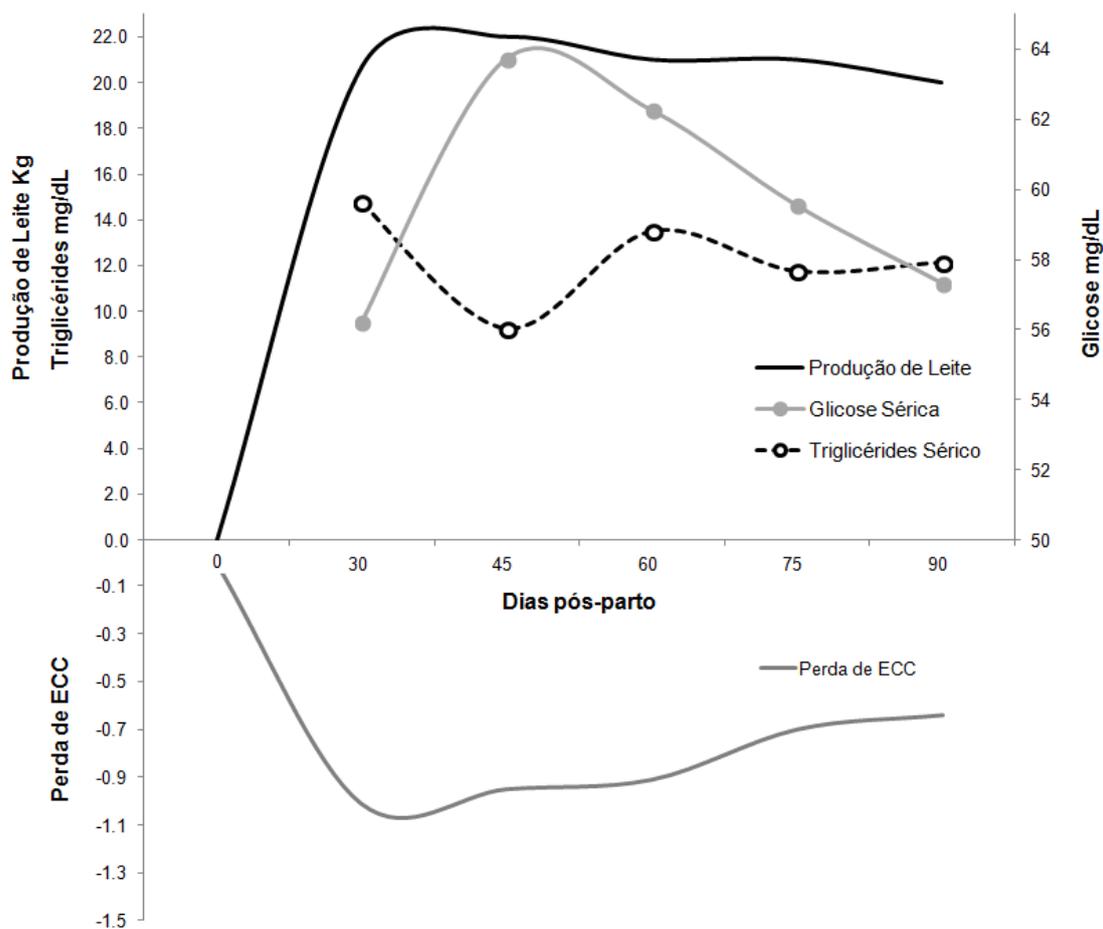


FIGURA 10 - Relação entre produção de leite, concentrações séricas de glicose e triglicérides e perda de escore de condição corporal (ECC), em pontos, até 90 dias de lactação em vacas da raça Girolando. Dados das variáveis obtidos nas estações do verão e inverno e expressos na forma de média ajustada pelos quadrados mínimos.

2.3 DISCUSSÃO

A avaliação das condições de temperatura e umidade relativa do ar, calculando o ITU nos sistemas de produção é uma estratégia útil para verificar a condição de conforto térmico. Pesquisas com bovinos leiteiros são geralmente conduzidas em ambiente controlado, os quais, embora produzam mensurações precisas da resposta termorregulatória ao estresse pelo calor, consideram períodos curtos de tempo (SCHARF et al., 2011). No presente trabalho, as vacas foram mantidas no mesmo ambiente por todo o período de avaliação, tanto no verão quanto no inverno, e foi possível caracterizar os efeitos do estresse térmico (ET) sob os animais durante o verão, sustentado pelo aumento do ITU e da temperatura retal. Nesse estudo, utilizou-se a fórmula proposta por MADER et al. (2006), na qual considera-se a temperatura ambiente associada à umidade relativa. Para DIKMEN & HANSEN (2009), a temperatura de bulbo seco é um preditor da temperatura retal de vacas em lactação, criadas em clima subtropical, tão bom quanto o ITU. Os autores verificaram forte correlação ($r=1$) entre o ITU calculado pela fórmula aqui utilizada e aquela proposta por THOM (1959), a primeira descrita para esse fim.

Para ARMSTRONG (1994) o ITU de 72 seria indicativo de estresse térmico leve, o que poderia significar que o ITU de 71 obtido durante o verão não implicaria nessa condição para os animais estudados. Entretanto, MADER et al. (2006) observaram a influência da cor da pelagem sobre a condição de estresse térmico, mostrando que a equação por eles proposta, por ter sido desenvolvida a partir de dados experimentais com animais de pelagem escura tem sua melhor aplicação para essa condição. Mensurações de ITU, entre 70 e 74, indicam alerta para a situação de estresse térmico no sistema de produção. Essa é uma das características de animais Girolando, que apresentam diferentes colorações de pelagem (preto, castanho e vermelho) com várias tonalidades e manchas.

Em regiões de clima úmido a umidade parece ser o fator limitante no estresse térmico (BOHMANOVA et al., 2007). Raças zebuínas ou mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) possuem maior capacidade de termorregulação em virtude de fatores como pelagem, metabolismo, morfologia das glândulas sudoríparas (CARVALHO et al., 1995) e menor resistência dos

tecidos ao fluxo de calor dos órgãos internos para a superfície corporal (condução e convecção) (HANSEN, 2004). Durante a evaporação, entre 70 e 85% da perda de calor máxima é devido à transpiração e o restante pela respiração (FINCH, 1986). Para aumentar a perda de calor, animais de raças taurinas, menos adaptadas aos ambientes desfavoráveis podem aumentar a FR em função da menor capacidade de transpiração. Nesse estudo, não foi observada alteração na FR das vacas Girolando entre estações, demonstrando a maior capacidade de termorregulação, via transpiração, e adaptação da raça ao clima tropical.

SCHARF et al. (2011), utilizando diferentes variáveis ambientais, relacionadas ao animal no desenvolvimento de modelos para prever situações de ET, verificaram que a temperatura ambiente e a corporal são preditores melhores que a FR, para animais avaliados a campo. Correlação negativa entre a FR e TR foi relatada em vacas holandesas lactantes durante o verão, na dependência da temperatura ambiente mais amena durante a noite, favorecendo a compensação do mecanismo termorregulatório dependente da FR (UMPHREY et al., 2001). Em outro estudo, desenvolvido com vacas holandesas em lactação durante diferentes estações do ano mantidas em ambiente tropical, foi demonstrada a correlação positiva entre TR e FR (MARTELLO et al., 2010).

As condições de estresse térmico e de balanço energético negativo em vacas leiteiras têm sido associadas com redução da ingestão de matéria seca (WOLFENSON et al., 2000), perda da condição corporal (PRYCE et al., 2001), baixas taxas de concepção (NABENISHI et al., 2011) e ineficiência reprodutiva (BROWN et al., 2012). Nas duas estações verificou-se perda de escore corporal logo após o parto (Figura 10). No entanto, no verão, após o primeiro mês de lactação, ou seja, o nadir da condição corporal, as vacas não restabeleceram o ECC até o dia 90 pós-parto, sugerindo o efeito deletério do estresse térmico sobre o desempenho produtivo. Vacas leiteiras são menos tolerantes ao calor durante a lactação em virtude do aumento na produção de calor metabólico associado com a produção láctea (CHEBEL et al., 2004). O aumento da temperatura corporal provoca a diminuição da ingestão de matéria seca para redução da produção de calor metabólico e controle da homeotermia (HANSEN, 2004). Perdas da condição corporal durante a lactação estão associadas com balanço energético (BE) (WALTERS et al., 2002) e ingestão de matéria seca (IMS) a qual, por sua

vez, atua como mediador importante dos efeitos do BE sobre a função reprodutiva (PATTON et al., 2007).

Os resultados demonstraram que em ambas as estações, as concentrações de glicose sérica decresceram a partir de 45 dias de lactação e foram menores durante o verão. Não houve efeito da estação sobre a concentração de glicose folicular, porém foram observadas correlações positivas entre as concentrações séricas e foliculares, assim como da glicose com sódio, potássio e cálcio no fluido folicular, ou seja, alterações das concentrações séricas de glicose causadas pelo BEN são refletidas no ambiente do folículo dominante, o que pode explicar a diminuição da fertilidade de vacas leiteiras no início da lactação e em condições de BEN.

A glicose é o principal combustível metabólico do ovário (RABIEE et al., 1997). No entanto, no início da lactação as concentrações séricas decrescem junto com a insulina, IGF-1 e LH (BUTLER et al., 2004). Ao contrário, as concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e de betahidroxibutirato (B-HBA) aumentam no mesmo período (FALKENBERG et al., 2008). Nessa situação, os AGNE elevados agem como antagonistas à insulina, prejudicando o transporte de glicose para as células foliculares e a atividade ovariana (WILLIAMS et al., 2001).

Em ambas as estações as concentrações séricas e foliculares de colesterol aumentaram após 45 dias de lactação. Entre 30 e 90 dias pós-parto as concentrações foliculares corresponderam entre 61% e 47% daquelas séricas no verão e inverno, respectivamente. Resultados semelhantes foram reportados por LEROY et al. (2004a, 2004b). Os indicadores de produção (IMS e produção de leite) e metabólitos (glicose, IGF-I e insulina) são determinantes para as concentrações de colesterol no sangue (FRANCISCO et al., 2003). Concentrações séricas de colesterol foram positivamente associadas com expressão de estro na primeira ovulação, redução do intervalo parto à concepção e probabilidade de prenhez (WESTWOOD et al., 2002).

RABIEE et al. (1997) relataram que a absorção de colesterol não era um fator limitante na produção de hormônios esteroides, contudo a absorção de glicose e colesterol pelo ovário estão fortemente correlacionados em bovinos (RABIEE & LEAN, 2000). Sustentado pelo relato científico anterior, observou-se,

nesse estudo, correlação positiva entre as concentrações séricas e foliculares de colesterol, e associação positiva com as concentrações de glicose, sódio, potássio e cálcio presentes no fluido folicular. Dessa forma, demonstrou-se também que glicose e colesterol desempenham papel importante na composição iônica do microambiente folicular pela sua associação com eletrólitos, até 90 dias de lactação.

As concentrações séricas de triglicérides no inverno e foliculares em ambas as estações decresceram entre os dias 30 e 45 da lactação, enquanto no verão observou-se a estabilidade nas concentrações séricas, seguido de elevação acentuada no fluido folicular. Baixa concentração sérica de triglicérides e glicose associado a AGNE elevados, no início da lactação, indicam mobilização de ácidos graxos dos adipócitos, caracterizando o balanço energético negativo (VAZQUEZ-ANON et al., 1994; MANI et al., 2009). A ausência de correlação entre as concentrações séricas e foliculares de triglicérides, com associações positivas com o colesterol no fluido folicular do folículo dominante, pode ser devido ao fato de que a maior parte do colesterol sanguíneo bovino está contido em lipoproteínas de alta densidade (HDL) (REECE, 2004).

O fluido folicular bovino contém apenas HDL, cujas concentrações se elevam com a maturação folicular, quando ocorre aumento da vascularização e da permeabilidade em torno do folículo dominante. Dessa forma, o HDL contribui como fonte de colesterol para o tecido ovariano, principalmente durante a fase periovulatória (BRANTMEIER et al., 1987). Atribui-se aos triglicérides a função de reserva estratégica de energia que pode ser requisitada em momentos críticos do metabolismo ou durante eventos reprodutivos. Por outro lado, o excesso de lipídeos no fluido folicular, induzido por dietas ricas em gordura, pode causar lipotoxicidade em células ovarianas, disfunção mitocondrial, estresse no retículo endoplasmático, aumento dos níveis de cálcio folicular, apoptose, anovulação e diminuição das taxas de fertilização em camundongos e mulheres (WU et al., 2010).

Um mecanismo importante para redução dos níveis de amônia no corpo é sua conversão pelo fígado em ureia que, posteriormente, pode ser excretada pelos rins ou reciclada no rúmen como fonte de nitrogênio para síntese microbiana (REECE, 2004). A utilização de dietas ricas em proteína

comprometem a fertilidade de vacas leiteiras pela ação direta da concentração de ureia sobre o trato reprodutivo (ELROD et al., 1993; BUTLER et al., 1996; NOUROZI et al., 2010; SAWA et al., 2011), porém essas evidências não foram relatadas por OLIVEIRA et al. (2004) que administraram dietas com diferentes teores de ureia e não observaram efeito sobre a dinâmica folicular de vacas Girolando. Assim como, REHAK et al. (2009) que avaliaram os dados de rebanhos comerciais de vacas Holandesas (n=1333) e não constataram a relação entre ureia no leite e probabilidade de concepção.

Independente da estação, as concentrações séricas de ureia foram 55% superiores às foliculares, porém sem correlação entre essas concentrações, ao contrário dos achados de outros estudos (LEROY et al., 2004a, 2004b). Contudo, associação positiva entre ureia e cálcio folicular foi verificada, o que pode refletir na composição iônica do fluido folicular e posterior qualidade do ovócito. A ureia é importante para a manutenção da hidratação (SANDS, 1999) e a expressão de transportadores secundários de ureia sódio-dependente para a reabsorção ativa foram identificados em ratos que receberam dietas pobres em proteína (SANDS et al., 1996), ou seja, existem mecanismos que mantêm a homeostasia folicular protegendo os ovócitos dos altos níveis de ureia sérica e folicular, no entanto esses dispositivos de controle ainda não foram elucidados. Alterações nas concentrações de ureia no meio durante a maturação de ovócitos interferiu nos índices de produção de blastocistos. Mudanças de pH comprometeram as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, sugerindo que alterações nos níveis de ureia e pH uterino, associadas a dietas ricas em proteína, podem causar infertilidade (OCON & HANSEN, 2003).

Nos bovinos o conteúdo de água corporal varia entre 60 e 65%, sendo 50% distribuídos na forma de líquidos intracelulares e 15% extracelulares (espaços intersticiais e plasma sanguíneo), e a homeostasia desse sistema é dependente do equilíbrio eletrolítico entre cátions e ânions (REECE, 2004). Os resultados desse estudo demonstraram o decréscimo das concentrações séricas dos íons sódio e potássio no verão. Estes eletrólitos, água e cloro são componentes importantes do suor, e a transpiração é um dos principais mecanismos termorreguladores utilizados para dissipar o calor corporal em

excesso (KADZERE et al., 2002; COZZI et al., 2011), principalmente nos zebuínos (CARVALHO et al., 1995).

A associação positiva entre as concentrações de sódio e potássio no fluido folicular foi verificada, assim como a correlação desses metabólitos no mesmo compartimento com glicose e colesterol. Entre os metabólitos avaliados, glicose, colesterol e cálcio apresentaram correlação entre a concentração sérica e folicular. A presença de triglicérides, ureia, sódio e potássio no fluido folicular pode estar condicionada ao metabolismo local pela presença de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, moléculas com potencial osmótico capaz de recrutar fluidos e cátions para o antro folicular a partir do estroma circundante (CLARKE et al., 2006).

Os resultados relativos ao fluido folicular foram obtidos de amostras coletadas *in vivo*, diferentes dos dados reportados por outros estudos (WISE, 1987; LEROY et al., 2004b; IWATA et al., 2004) que trabalharam com ovários de abatedouro. Alterações *post-mortem* antes da colheita dos ovários modificam as concentrações foliculares de sódio e potássio (KNUDSEN et al., 1979).

Dos metabólitos avaliados nesse estudo, o cálcio foi o que apresentou maior possibilidade de integração e correlação positiva no fluido folicular (Tabela 2), mostrando associação entre as concentrações séricas e foliculares, evidenciando a importância do cálcio para o ambiente folicular. A sinalização do cálcio regula eventos intracelulares essenciais para a fertilização e desenvolvimento embrionário, participando de processos como a retomada da meiose, bloqueio à polispermia, ativação do mRNA materno para ativação do genoma embrionário e implantação do embrião (CARROLL, 2000; AJDUK et al., 2008). Entretanto, tais mecanismos são dependentes do influxo de íons cálcio a partir de espaços extracelulares (TOSTI, 2006) e do estado de armazenamento do cálcio intracelular, o que modifica sua distribuição nos ovócitos durante a foliculogênese (ROZINEK et al., 2006). Esse dado pode ser sugestivo de que a redução nas concentrações de cálcio sérico ou folicular durante a vida reprodutiva de matrizes leiteiras pode comprometer os estoques de ovócitos dos folículos pré-antrais e antrais e seu desenvolvimento ao longo do crescimento folicular, interferindo na regulação da competência meiótica. Nesse sentido, dados recentes mostraram que baixas concentrações séricas de cálcio, durante as três

primeiras semanas após o parto, foram associadas com menor taxa de concepção à primeira inseminação (CHAPINAL et al., 2012).

2.4 CONCLUSÃO

Os efeitos deletérios do balanço energético negativo associado ao estresse térmico aumentam a perda de escore corporal de vacas leiteiras e diminuem as concentrações séricas de glicose, sódio e potássio durante o verão. As alterações nas concentrações sanguíneas de glicose, colesterol total e cálcio são refletidas no fluido folicular dos folículos dominantes, com associação entre glicose, colesterol e os íons sódio, potássio e cálcio. Atenção especial deve ser dada aos eletrólitos durante a lactação, pois são essenciais para a osmolalidade do ambiente folicular e necessários para eventos intracelulares referentes à competência ovocitária e desenvolvimento embrionário.

2.5 REFERÊNCIAS

AJDUK, A.; MALAGOCKI, A.; MALESZEWSKI, M. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v.8, n.1, p.3-22, 2008.

ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2044-2050, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE GIROLANDO - ABCG 2011. Anuário do Serviço de Controle Leiteiro da Girolando. 2011, p.151. Disponível em: <http://www.girolando.com.br/site/contleiteiro/controleleiteiro.php>

BELYEA, R.L.; MARTZ, F.A.; YOUNG, R.D.; CLARK, J.L. Effects of dietary potassium and rumen contents upon K estimation of body composition in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.46, n.1, p.320-327, 1978.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J.B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.4, p.1947-1956, 2007.

BRANTMEIER, S.A.; GRUMMER, R.R.; AX, R.L. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.10, p.2145-2149, 1987.

BROWN, K.L.; CASSELL, B.G.; MCGILLIARD, M.L.; HANIGAN, M.D.; GWAZDAUSKAS, F.C. Hormones, metabolites, and reproduction in Holsteins, Jerseys, and their crosses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.2, p.698-707, 2012.

BUTLER, W.R.; CALAMAN, J.J.; BEAM, S.W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.74, n.4, p.858-865, 1996.

BUTLER, S.T.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v.127, n.5, p.537-545, 2004.

CARROLL, J. Na⁺-Ca²⁺ exchange in mouse oocytes: modifications in the regulation of intracellular free Ca²⁺ during oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.118, n.2, p.337-342, 2000.

CARVALHO, F.A.; LAMMOGLIA, M.A.; SIMÕES, M.J.; RANDEL, R.D. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.73, n.12, 3570-3573, 1995.

CHAPA, A.M.; McCORMICK, M.E.; FERNANDEZ, J.M.; FRENCH, D.D.; WARD, J.D.; BEATTY, J.F. Supplemental dietary protein for grazing dairy cows: reproduction, condition loss, plasma metabolites, and insulin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.4, p.908-916, 2001.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.E.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; GODEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J.E.P.; OVERTON, M.W.; DUFFIELD, T.F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.3, p.1301-1309, 2012.

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.; CERRI, R.I.; JUCHEM, S.O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.84, n.3-4, p.239-255, 2004.

CLARKE, H.G.; HOPE, S.A.; BYERS, S.; RODGERS, R. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, Cambridge, v.132, n.1, p.119-131, 2006.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A.L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, n.8, p.3895-3901, 2011.

DIKMEN, S.; HANSEN, P.J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.1, p.109-116. 2009.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, New York, v.60-61, p.743-752, 2000.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A. Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.1, p.68-78, 1989.

ELROD, C.C.; VAN AMBURGH, M.; BUTLER, W.R. Alterations of pH in Response to Increased Dietary Protein in Cattle are Unique to the Uterus. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.71, n.3, p.702-706, 1993.

FAHIMINIYA, S.; GERARD, N. Follicular fluid in mammals. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, Issy les Moulineaux, v.38, n.6, p.402-404, 2010.

FALKENBERG, J.; HAERTEL, J.; ROTTER, K.; IWERSEN, M.; ARNDT, G.; HEUWIESER, W. Relationships Between the Concentration of Insulin-Like Growth Factor-1 in Serum in Dairy Cows in Early Lactation and Reproductive Performance and Milk Yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.10, p.3862-3868, 2008.

FINCH, V.A. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.62, n.2, 531-542, 1986.

FRANCISCO, C.C.; SPICER, L.J.; PAYTON, M.E. Predicting Cholesterol, Progesterone, and Days to Ovulation Using Postpartum Metabolic and Endocrine Measures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.9, p.2852-2863, 2003.

GWAZDAUSKAS, F.C.; KENDRICK, K.W.; PRYOR, A.W.; BAILEY, T.L. Impact of Follicular Aspiration on Folliculogenesis as Influenced by Dietary Energy and Stage of Lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.7, p.1625-1634, 2000.

HANSEN, L.B. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.5, p.1145-1150, 2000.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, New York, v.82-83, p.349-360, 2004.

IWATA, H.; HASHIMOTO, S.; OHOTA, M.; KIMURA,.; SHIBANO, K.; MIYAKE, M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v.127, n.2, p.159-164, 2004.

KADZERE, C.T.; MURPHY, M.R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, Maryland Heights, v.77, n.1, p.59-91, 2002.

KENDRICK, K.W.; BAILEY, T.L.; GARST, A.S.; PRYOR, A.W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R.M.; EYESTONE, W.E.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of Energy Balance on Hormones, Ovarian Activity, and Recovered Oocytes in Lactating Holstein Cows Using Transvaginal Follicular Aspiration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1731-1740, 1999.

KNUDSEN, J.F.; LITKOWSKI, L.J.; WILSON, T.L.; GUTHRIE, H.D.; BATTA, S.K. Follicular fluid electrolytes and osmolality in cyclic pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.57, n.2, p.419-22, 1979.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, New York, v.62, n.6, p.1131-1143, 2004a.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.80, n.3-4, p.201-211, 2004b.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1277-1293, 2001.

MADER, T.L.; DAVIS, M.S.; BROW-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.84, n.3, p.712-719, 2006.

MANI, O.; SORENSEN, M.T.; SERJSEN, K.; BRUCKMAIER, R.M.; ALBRECHT, C. Differential expression and localization of lipid transporters in the bovine mammary gland during the pregnancy-lactation cycle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.8, p.3744-3756, 2009.

MARTELLO, L.S.; JUNIOR, H.S.; SILVA, S.L.; BALIEIRO, J.C. Alternative Body sites for heat stress measurement in milking cows under tropical conditions and their relationship to the thermal discomfort of the animals. **International Journal of Biometeorology**, New York, v.54, n.6, p.647-652, 2010.

MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.3, p.1257-1266, 2012.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZWA, K.; TSUZUKI, Y. Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. **Journal of Reproduction and Development**, Cambridge, v.57, n.4, p.450-456, 2011.

NOUROZI, M.; MOUSSAVI, A.H.; ABAZARI, M.; ZADEH, M.R. Milk Urea Nitrogen and Fertility in Dairy Farms. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Pakistan, v.9, n.10, p.1519-1525, 2010.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF DAIRY CATTLE. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press; 2001.

OCON, O.M.; HANSEN, P.J. Disruption of Bovine Oocytes and Preimplantation Embryos by Urea and Acidic pH. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.4, p.1194-1200, 2003.

OLIVEIRA, M.M.N.F.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P.; CARVALHO, G.R. Ureia para Vacas Leiteiras no Pós-Parto: Teor Plasmático de Ureia e pH Uterino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p.123-127, 2004.

PATTON, J.; KENNY, D.A.; McNAMARA, S.; MEE, J.F.; O'MARA, F.P.; DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J. Relationships Among Milk Production, Energy Balance, Plasma Analytes, and Reproduction in Holstein-Friesian Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.2, 649-658, 2007.

PRYCE, J.E.; COFFEY, M.P.; SIMM, G. The relationship between body condition score and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1508-1515, 2001.

RABIEE, A.R.; LEAN, I.J.; GOODEN, J.M.; MILLER, B.G.; SCARAMUZZI, R.J. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, New York, v.48, n.1, p.9-25, 1997.

RABIEE, A.R.; LEAN, I.J. Uptake of glucose and cholesterol by the ovary of sheep and cattle and the influence of arterial LH concentrations. **Animal Reproduction Science**, New York, v.64, n.3-4, p.199-209, 2000.

REECE, W.O. Dukes' Physiology of Domestic Animals. 12th Edition. Cornell University Press, 2004. 1024p.

REHAK, D.; RAJMON, R.; KUBESOVA, M.; STIPKOVA, M.; VOLEK, J.; JILEK, F. Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. **Czech Journal of Animal Science**, Praga, v.54, p.193-200, 2009.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J.F.; O'FARRELL, K.J.; MACSIURTAİN, M.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. **Theriogenology**, New York, v.63, n.3, p.939-949, 2005.

ROZINEK, J.; RAJMONA, R.; PETR, J.; ROHLIK, J.; JESETA, M.; SEDMIKOVA, M.; REHAK, D.R.; JILEK, F. Ultrastructural localization of calcium deposits in pig ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, New York, v.91, n.1-2, p.123-132, 2006.

RUBEL, F.; KOTTEK, M. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v.19, p.135-141, 2010.

SANDS, J.M.; MARTIAL, S.; ISOZAKI, T. Active urea transport in the rat inner medullary collecting duct: functional characterization and initial expression cloning. **Kidney International**, Saint Louis, v.49, n.6, p.1611-1614, 1996.

SANDS, J.M. Regulation of Renal Urea Transporters. **Journal of the American Society of Nephrology**, Gainesville, v.10, n.3, p.635-646, 1999.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.4, p.905-920, 2004.

SAS - User's Guide: statistics. 5.ed. Cary: SAS Institute, 2000. 1028p

SAWA, A.; BOGUCKI, M.; KREZEL-CZOPEK, S. Effect of some factors on relationships between milk urea levels and cow fertility. **Archiv Tierzucht/Archives Animal Breeding**, Dummerstorf, v.54, n.5, p.468-476, 2011.

SCHARF, B.; LEONARD, M.J.; WEABER, R.L.; MADER, T.L.; HAHN, G.L.; SPIERS, D.E. Determinants of bovine thermal response to heat and solar radiation exposures in a field environment. **International Journal of Biometeorology**, New York, v.55, n.4, p.469-480, 2011.

SILVA, A.A.; AZEVEDO, A.L.; VERNEQUE, R.S.; GASPARINI, K.; PEIXOTO, M.G.; DA SILVA, M.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.; MACHADO, M.A. Quantitative trait loci affecting milk production traits on bovine chromosome 6 in zebuine Gyr breed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, n.2, p.971-80, 2011.

THOM, E.C. The discomfort index. **Weatherwise**, Philadelphia, v.12, n.2, p.57-60, 1959.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v.4, n.26, 1996.

UMPHREY, J.E.; MOSS, B.R.; WILKOX, C.J. Interrelationships in lactating Holsteins of rectal and skin temperature, milk yield and composition, dry matter intake, body weight, and feed efficiency in summer in Alabama. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.12, p.2680-2685, 2001.

VAZQUEZ-ANON, M.; BERTICS, S.J.; LUCK, M.; GRUMMER, R.R.; PINJEIRO, J. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.6, p.1521-1528, 1994.

VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T.L.; EMERY, R.S.; CHAPIN, L.T.; FOGWELL, R.L. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.4, p.1063-1072, 1988.

VILLA-MANCERA, A.; MENDEZ-MENDOZA, M.; HUERTA-CRISPIN, R.; VAZQUEZ-FLORES, F.; CORDOVA-IZQUIERDO, A. Effect of climate factors on conception rate of lactating dairy cows in Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, New York, v.43, n.3, p.597-601, 2011.

WALTERS, A.H.; BAILEY, T.L.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.4, p.824-832, 2002.

WESTWOOD, C.T.; LEAN, I.J.; GARVIN, J.K. Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.12, p.3225-3237, 2002.

WILLIAMS, S.A.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B.; FOOT, R.; BLACKBERRY, M.A.; SCARAMUZZI, R.J. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. **Reproduction**, Cambridge, v.122, n.6, p.947-956, 2001.

WISE, T. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.64, n.4, p.1153-1169, 1987.

WILSON, S.J.; MARION, R.S.; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2124-2131, 1998.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, New York, v.60-61, p.535-547, 2000.

WU, L.L.Y.; DUNNING, K.R.; YANG, X.; RUSSEL, D.L.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R. High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.151, n.11, p.5438-5445, 2010.

CAPÍTULO 3 - Atividade ovariana e qualidade do ovócito associado ao perfil bioquímico sérico e do fluido folicular de vacas Girolando (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) durante o pós-parto, no verão e inverno

RESUMO

Este estudo foi delineado com o objetivo de avaliar a influência do estresse térmico (ET) e do balanço energético negativo (BEN) sobre: o perfil metabólico sérico e do fluido folicular (FF) de folículos dominantes; desenvolvimento folicular e; qualidade dos ovócitos de vacas Girolando. Ovócitos, amostras de sangue e FF (folículos ≥ 9 mm) foram obtidos nos dias 30, 45, 60, 75 e 90 do pós-parto nas estações do verão (n=30) e inverno (n=30). No momento da aspiração folicular transvaginal foram registrados o número de folículos presentes, a quantidade e qualidade dos ovócitos obtidos, a temperatura retal (TR) e o escore de condição corporal (ECC). A temperatura ambiente (TA) e a umidade relativa do ar (UR) foram obtidas em cada estação para o cálculo do índice de temperatura e umidade (ITU). Nas amostras de sangue e FF foram determinadas as concentrações de glicose, colesterol total (CT), triglicérides (TG), ureia, sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca). A TA, UR e ITU foram superiores ($P < 0,01$) no verão assim como a perda de ECC. O total de folículos aspirados foi maior ($P < 0,01$) no inverno e a média de ovócitos viáveis não diferiu entre estações. As concentrações séricas de glicose, ureia, Na e K foram superiores no inverno ($P < 0,05$). No FF as concentrações de CT, TG, ureia, K e Ca foram maiores no verão ($P < 0,05$). O total de folículos aspirados foi superior ($P < 0,01$) no inverno e a média de ovócitos viáveis obtidos por vaca não diferiu entre estações. Ovócitos degenerados demonstraram associação positiva ($P < 0,05$) com ITU ($r = 0,14$) e TA ($r = 0,13$) e negativa com as concentrações séricas de glicose ($r = -0,12$) e K ($r = -0,11$). O ET e o BEN causam alterações metabólicas que comprometem a foliculogênese, a dominância folicular e o ambiente folicular resultando no desenvolvimento de ovócitos morfologicamente comprometidos.

Palavras-chave: aspiração folicular; qualidade do ovócito; eletrólitos; estresse térmico; vaca leiteira

CHAPTER 3 - Ovarian activity and oocyte quality associated to serum and follicular fluid biochemical profile of Girolando cows (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) during postpartum in summer and winter

ABSTRACT

This work was delineated to evaluate the influence of heat stress (HS) and negative energy balance (NEB) under serum metabolic and dominant follicular fluid profile, follicular development and oocyte quality of Girolando cows. The oocytes, blood and follicular fluid samples (follicles ≥ 9 mm) were obtained on 30, 45, 60, 75 and 90 days of postpartum in summer (n=30) and winter (n=30). In the moment of transvaginal follicular aspiration, there were recorded data from follicles number, quality and amount of oocytes, rectal temperatures (RT) and body scores condition (BCS). The ambient air temperature (AT), relative humidity (RH) was collected in each season to calculate the temperature humidity index (THI). The glucose, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), urea, sodium (Na), potassium (K) and calcium (Ca) concentrations were determined on serum and follicular fluid (FF) samples. The RT, RH and THI were superior ($P<0.01$) on summer as well as BCS loss. The TC, TG, urea, K and Ca concentrations on FF were higher in summer ($P<0.05$). The serum concentrations of glucose, urea, Na and K were superior in winter ($P<0.05$). The total of aspirated follicles was higher ($P<0.01$) in winter and the mean of viable oocytes did not differ among seasons. Degenerate oocytes showed positive association ($P<0.05$) with THI ($r=0.14$) and AT ($r=0.13$), as well as negative correlation with glucose ($r=-0.12$) and K ($r=-0.11$) serum concentrations. The heat stress and NEB induce metabolic changes which compromise the folliculogenesis, follicular dominance and follicular environment resulting on oocytes development morphologically impaired.

Key words: follicular aspiration; oocyte quality; electrolytes; heat stress, dairy cattle

3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o rápido progresso da genética associado à gestão de recursos selecionou matrizes com alto mérito produtivo para atender a demanda da moderna indústria de laticínios. Porém, estão associados a este melhoramento distúrbios hormonais e metabólicos que durante a lactação comprometem a qualidade do ovócito e embrião, com consequente redução da fertilidade. Apesar de algumas pesquisas relacionarem estes distúrbios com o aumento da produção de leite, outros trabalhos apontaram para uma combinação de diversos fatores como doenças reprodutivas, estresse térmico e nutrição (BILBY et al., 2006; SEWALEM et al., 2008; SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010).

O entendimento da base fisiológica para o estudo da relação entre produção de leite e fertilidade é necessária. Uma vez esclarecida essa ligação, estratégias de manejo podem ser implementadas para neutralizar os efeitos da lactação na reprodução (LUCY, 2001). Uma forma de investigar as alterações ovarianas ocorridas durante o pós-parto é por meio da biotécnica de aspiração folicular transvaginal (AFT) que possibilita a identificação do tamanho folicular, a recuperação de ovócitos e fluido folicular e quando utilizada de forma periódica permite informações seguras da condição do status ovariano *in vivo* (GWAZDAUSKAS et al., 2000).

Definido como a incapacidade de um animal em lidar com seu ambiente e expressar seu potencial genético o estresse térmico está entre os fatores que mais contribuem para a baixa fertilidade de vacas leiteiras (DOBSON & SMITH, 2000). Cerca de 60% da população mundial de bovinos leiteiros é acometida por temperaturas elevadas durante o verão, comprometendo a função folicular (ROTH et al., 2001). Vaca expostas ao estresse térmico durante o ciclo estral mostraram dinâmica folicular alterada e dominância folicular atenuada no ciclo subsequente, além da redução da produção de esteroides (WOLFENSON et al., 1997; ROTH et al., 2000). Porém, grande parte dos estudos disponíveis na literatura especializada utilizaram raças *Bos taurus taurus* na sua metodologia. Pesquisas relacionadas ao desempenho reprodutivo de raças leiteiras mestiças como a Girolando (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*) manejadas em clima tropical no bioma cerrado, um ambiente naturalmente favorável ao estresse

térmico, ainda são escassas. Portanto, objetivou-se com este estudo determinar a influência da estação do ano e do balanço energético negativo sobre: o perfil metabólico sérico e do fluido folicular de folículos dominantes; desenvolvimento folicular e; qualidade dos ovócitos obtidos de vacas Girolando.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Animais e local

Vacas da raça Girolando a partir da terceira ordem de lactação foram utilizadas durante o inverno (n=30) e verão (n=30), entre julho de 2011 e fevereiro de 2012. O experimento foi realizado na fazenda experimental da Universidade Federal de Uberlândia, localizada no bioma cerrado, latitude 18° 55' 08" sul e longitude 48° 16' 37" oeste, 776 metros acima do nível do mar, com clima tropical de altitude tipo CWA segundo Köppen (RUBEL & KOTTEK, 2010). As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia com produção média de leite por animal dia de 19,0 ± 0,6 kg (verão) e 20,0 ± 0,5 kg (inverno) e média de produção por lactação (305 dias) de 5947,5 kg. Durante o verão foram manejadas em piquetes de *Cynodon spp.* cv. Tifton 85, suplementadas com concentrado (24% de PB) e núcleo mineral (Composição da dieta % MS = 15,1% PB; 62% NDT; 23,7% FDA; 41,5% FDN e 1,4 Mcal/kg de MS de Energia Líquida) e no inverno em sistema de confinamento com fornecimento de dieta total com silagem de sorgo, concentrado (24% de PB) e núcleo mineral (Composição da dieta % MS = 13,9% PB; 65% NDT; 26,2% FDA; 40,7% FDN e 1,5 Mcal/kg de MS de Energia Líquida), formuladas de acordo com as exigências nutricionais para manutenção e produção de leite (NRC, 2001).

3.1.2 Temperatura retal, escore de condição corporal e variáveis meteorológicas

As variáveis clínicas temperatura retal (TR), escore de condição corporal (ECC), avaliada em escala de 1 (magra) a 5 (gorda), com variações de 0,25 pontos (EDMONSON et al., 1989) e peso corporal foram registradas durante as aspirações foliculares. A temperatura média ambiente (TA) e a umidade relativa do ar (UR) foram obtidas da estação meteorológica do Laboratório de Climatologia da Universidade Federal de Uberlândia, localizada a 2 km da

fazenda experimental. O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado de acordo com a equação (MADER et al., 2006):

$$\text{ITU} = [0,8 \times \text{TA}] + [(\text{UR} \div 100) \times (\text{TA} - 14,4) + 46,4]$$

TA: temperatura média ambiente (°C);

UR: umidade relativa do ar (%)

3.1.3 Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia

Aspirações foliculares guiadas por ultrassonografia foram realizadas em todas as vacas durante as estações do inverno e verão nos dias 30, 45, 60, 75 e 90 após o parto. Para aspiração folicular transvaginal (AFT) foram utilizados os seguintes equipamentos: ultrassom (SSD-500 Aloka[®]) com transdutor microconvexo de 5 MHz acoplado a guia de biópsia (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada[®]), linha de aspiração (WTA[®]) com cateter 16G x 5,25 in (1,7 mm x 133 mm; Angiocath BD[®]) e bomba (Brawmed[®]) para pressão de vácuo ajustada em volume de água por minuto (16 mL/min).

Após higienização do períneo e aplicação de anestesia epidural (4 mL de lidocaína a 2%; Pearson, Eurofarma[®]), a guia de aspiração foi inserida na vagina, e os folículos ovarianos classificados de acordo com seu diâmetro em pequenos (2-4 mm); médios (5-8 mm) e grandes (≥ 9 mm). Além disso, a presença ou ausência do corpo lúteo foi utilizada para caracterizar a condição reprodutiva das vacas em ciclando e não ciclando, respectivamente.

Inicialmente, com auxílio de uma seringa de 5 mL (Descarpack[®]) acoplada à linha de aspiração, apenas o fluido folicular de folículos grandes (≥ 9 mm) foi aspirado. Em seguida, foi realizada a aspiração dos folículos pequenos e médios. As amostras de fluido folicular obtidas foram centrifugadas imediatamente após a coleta (2100 x g; 30 min) e o sobrenadante armazenado a -20°C para posterior análise bioquímica. Somente amostras de fluido folicular livres de contaminação com sangue foram utilizadas.

Os ovócitos recuperados foram coletados em meio contendo solução fosfatada tamponada (PBS), com 10% de soro fetal bovino (Cultilab[®]) e 7,5 UI/mL de heparina sódica (Liquemine[®]). Em seguida foram drenados em filtro coletor

(Cultilab[®]) e transferidos em placas de Petri (60 x 15 mm, Cral[®]) na qual foram lavados três vezes em meio TCM 199 HEPES suplementado com bicarbonato de sódio (5 mM), piruvato (4 mM), soro fetal bovino (10%) e sulfato de amicacina (80 µg/µL).

3.1.4 Classificação dos ovócitos

Escores de pontuação foram utilizados para a avaliação da qualidade dos ovócitos recuperados com base na aparência do citoplasma e densidade das células do cumulus ao redor do ovócito, formando o complexo cumulus-ovócito (CCO). Utilizando um estereoscópio no aumento de 40X a seguinte classificação foi utilizada: ovócitos grau I (GI), mais de 3 camadas compactas de células do cumulus e citoplasma homogêneo; ovócitos grau II (GII), duas camadas compactas de células do cumulus com o citoplasma menos homogêneo em relação ao anterior; ovócitos grau III (GIII), camada irregular com poucas células do cumulus e citoplasma escuro; ovócitos degenerados (DEG), ausência ou expansão de células do cumulus, citoplasma escuro e irregular.

3.1.5 Obtenção das amostras de sangue

Amostras de sangue foram colhidas de todas as vacas submetidas às sessões de AFT durante as estações do inverno e verão. A veia coccígea foi puncionada com agulha hipodérmica 18G (4,0 cm x 1,2 mm; BD[®]) e o sangue armazenado em tubos a vácuo estéreis. Em seguida, as amostras foram refrigeradas a 4°C e enviadas ao laboratório para centrifugação (2100 x g; 30 min). O soro obtido foi aliqotado e armazenado a -20°C para posterior análise bioquímica.

3.1.6 Análise bioquímica - Soro e fluido folicular

As concentrações de glicose (mg/dL) no sangue e fluido folicular (FF) foram determinadas durante os procedimentos de aspiração folicular por meio de tiras reagentes (Accu-Chek Active; Roche Diagnostics[®]). O colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram determinados (mg/dL) por reação enzimática de ponto final (Colesterol Liquiform e Triglicérides Liquiform; Labtest Diagnostica[®]) e a ureia (mg/dL) calculada por reação enzimática e fotometria ultravioleta usando cinética de dois pontos (Ureia UV Liquiform; Labtest Diagnostica[®]). Todos os kits comerciais foram executados no analisador bioquímico semiautomático Bio-2000 BIOPLUS[®] (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda.). As dosagens dos íons sódio (Na), potássio (K) e cálcio (Ca) foram determinados (mmol/L) pelo método de eletrodo íon-seletivo, utilizando o analisador eletrolítico AVL 9180 (Roche Diagnostics[®]).

As análises realizadas seguiram os procedimentos sugeridos pelos fabricantes e os coeficientes de variação intraensaio e inter-ensaio foram menores que 5%.

3.1.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 5. As informações foram trabalhadas de modo a se obter um conjunto de dados estruturado, que permitisse o início das análises preliminares. As análises de crítica e consistência dos dados foram realizadas por meio do procedimento UNIVARIATE (SAS, 2000) para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância. Os melhores ajustes para as variáveis: número de folículos pequenos (diâmetro entre 2 e 4 mm) e médios (5 e 8 mm), no momento da aspiração folicular; qualidade de ovócito grau I, grau II, grau III e degenerado; total de ovócitos recuperados por vaca e total de ovócitos viáveis por aspiração foram obtidos pela transformação logarítmica [$\log(X)$]. Para a variável contagem

de folículos grandes (≥ 9 mm) o melhor ajuste foi obtido pela transformação radicial (\sqrt{x}).

Em seguida, análises de variância foram realizadas utilizando-se o método dos quadrados mínimos por meio do procedimento GLM (SAS, 2000). As médias ajustadas e o teste de média “t” foram obtidos através da opção LSMEANS do procedimento GLM (SAS, 2000). O seguinte modelo foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + Tr_i + e_{ij}$$

onde:

Y_{ij} é a observação do animal j, pertencente ao i-ésimo tratamento;

μ é a média geral da variável dependente em estudo;

Tr_i é o efeito fixo do i-ésimo tratamento; e

e_{ijk} é o erro aleatório associado a cada observação ij, pressuposto normalmente distribuído e independente com média zero e variância σ^2 .

Para o estudo da intensidade com que se manifesta a associação entre duas variáveis, optou-se pelo uso do coeficiente de correlação de Pearson, obtido pelo procedimento CORR (SAS, 2000). Os coeficientes de correlação (r) foram classificados como forte ($r > 0,6$), moderado (r entre 0,6 e 0,4) e fraco ($r < 0,4$). Os valores reportados estão expressos na forma de média ajustada pelos quadrados mínimos e erro padrão da média (epm). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3.2 RESULTADOS

As variáveis climáticas temperatura ambiente, umidade relativa do ar e ITU foram superiores ($P < 0,01$) durante o verão, seguido do aumento da temperatura retal (38,5 vs. 38,2; $P < 0,01$), demonstrando um ambiente favorável ao estresse térmico (Tabela 1). A perda ($P < 0,05$) do escore de condição corporal no período avaliado (30 e 90 dias pós-parto) ocorreu em ambas as estações, porém no verão foi maior ($0,89 \pm 0,04$ vs. $0,39 \pm 0,02$). No inverno, as vacas aos 90 dias de lactação, restabeleceram a condição corporal em relação ao nadir da estação que ocorreu aos 45 dias pós-parto. Por outro lado, no verão, o escore corporal aos 30 ($2,4 \pm 0,1$) e 90 dias pós-parto ($2,6 \pm 0,08$) não diferiu ($P > 0,05$) e, quando comparada a condição corporal aos 90 dias entre estações, no inverno foi superior ($3,0 \pm 0,05$ vs. $2,6 \pm 0,08$; $P < 0,01$) (Figura 1).

TABELA 1 - Média \pm (epm) e variação da temperatura ambiente (TA), umidade relativa (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período avaliado nas estações do verão e inverno

Estação	TA (°C)	UR (%)	ITU
Verão	$23,8 \pm 0,1^+$	$66,4 \pm 1,5^+$	$71,0 \pm 0,04^+$
	(18,6 - 32,5)	(31,0 - 95,0)	(69,2 - 71,5)
Inverno	$22,9 \pm 0,1$	$40,5 \pm 0,7$	$67,9 \pm 0,1$
	(13,5 - 33,2)	(14,0 - 74,0)	(64,9 - 70,1)

Diferença estatística entre estações para as variáveis climáticas ($^+P < 0,01$).

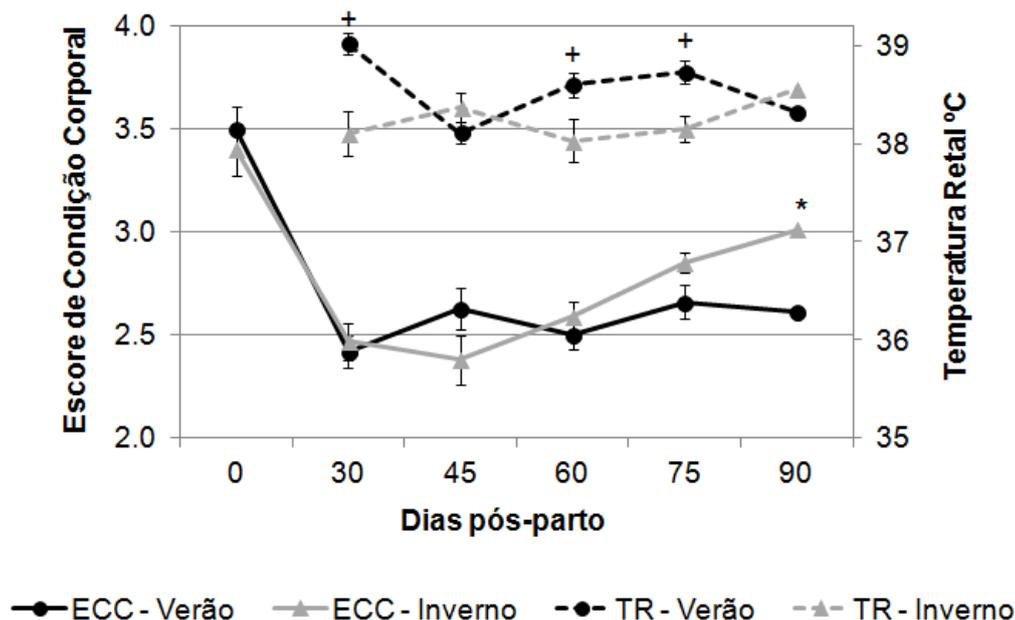


FIGURA 1 - Média \pm (epm) do escore de condição corporal (ECC) e temperatura retal (TR), de vacas Girolando durante o pós-parto, nas estações do verão e inverno. Diferença estatística entre estações para ECC ($^*P < 0,01$) e TR ($^+P < 0,01$).

O total de 3805 folículos foram quantificados antes do procedimento de AFT. A média de folículos computados por vaca, independente do tamanho, foi superior ($P < 0,01$) no inverno ($13,7 \pm 0,4$ vs. $11,6 \pm 0,6$), principalmente aos 30 ($14,4 \pm 0,7$ vs. $9,2 \pm 0,5$; $P < 0,01$) e 90 dias ($14,4 \pm 0,9$ vs. $11,3 \pm 0,9$; $P < 0,05$) de lactação (Figura 2a). O número de folículos pequenos (2 a 4 mm) foi maior ($P < 0,01$) no inverno ($8,0 \pm 0,4$ vs. $7,0 \pm 0,6$) permanecendo constante até 90 dias pós-parto, ao contrário do verão onde o nadir para contagem de folículos ($P < 0,05$) foi aos 30 dias de lactação ($4,3 \pm 0,5$) (Figura 2b).

A quantidade de folículos médios (5 a 8 mm) foi maior ($P < 0,05$) no inverno ($4,2 \pm 0,2$ vs. $3,5 \pm 0,2$), decrescendo ($P < 0,05$) a partir de 30 dias pós-parto para ambas as estações. No entanto, no inverno houve aumento ($P < 0,05$) da população folicular após 60 dias de lactação que, por sua vez no verão, só ocorreu mais tarde aos 75 dias pós-parto (Figura 2c).

O número de folículos grandes (≥ 9 mm) foi maior durante o inverno ($1,5 \pm 0,06$ vs. $1,1 \pm 0,07$; $P < 0,01$), principalmente aos 30 dias de lactação, no

qual foi observado o dobro ($P < 0,01$) de folículos dominantes ($1,5 \pm 0,1$) em relação ao verão ($0,7 \pm 0,1$). Apesar da maior quantidade de folículos grandes no inverno, essa diferença não foi significativa ($P > 0,05$) aos 45, 60 e 90 dias pós-parto (Figura 2d).

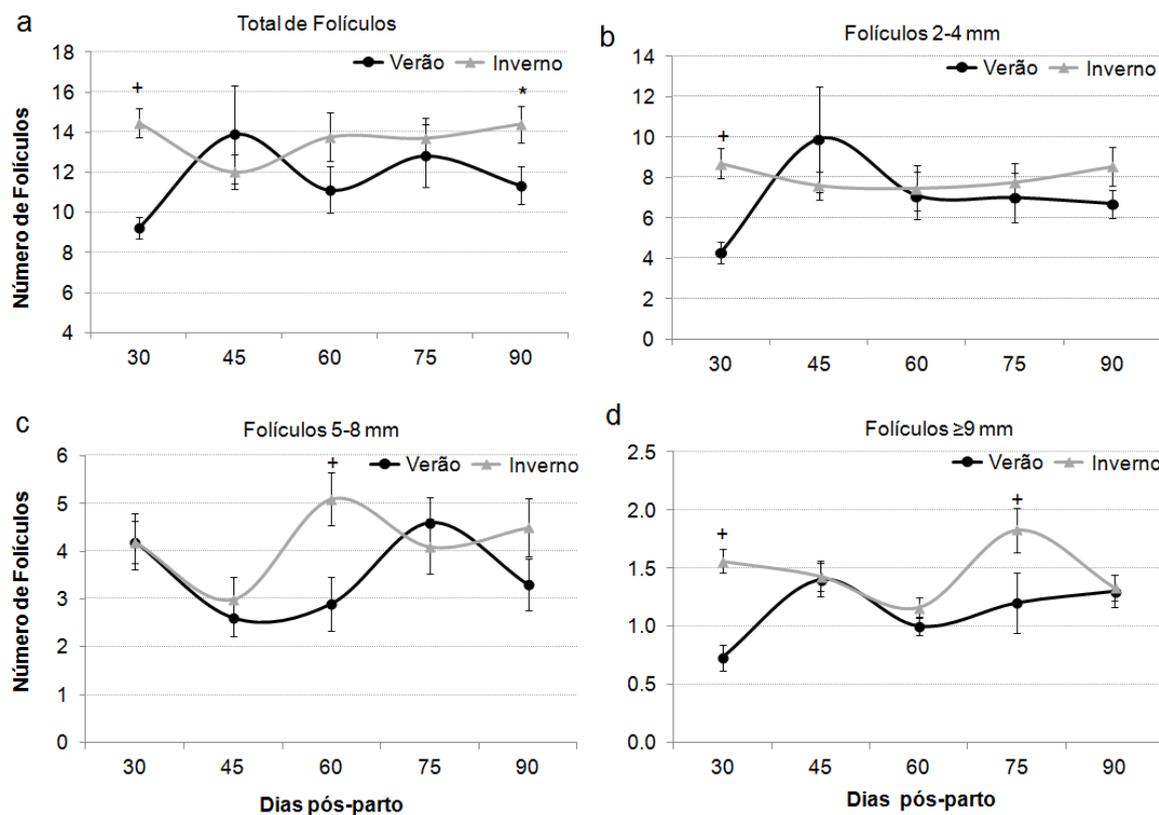


FIGURA 2 - Média \pm (epm) de folículos ovarianos antes da aspiração folicular transvaginal, entre 30 e 90 dias do pós-parto, durante o verão e inverno. (a) total de folículos, (b) folículos com diâmetro entre 2 e 4 mm, (c) folículos entre 5 e 8 mm e (d) folículos dominantes \geq 9 mm. Diferença estatística entre estações para quantidade de folículos no momento da aspiração folicular transvaginal (* $P < 0,05$; ⁺ $P < 0,01$).

Durante os procedimentos de aspiração folicular foi obtido o total de 1936 ovócitos (50,8%). A média de ovócitos recolhidos por vaca não diferiu ($P > 0,05$) entre as estações (verão: $7,0 \pm 0,8$; inverno: $5,9 \pm 0,3$) e quando comparada a média de ovócitos obtidos durante o período da lactação, em cada estação, não houve diferença ($P > 0,05$) no verão (30 dias: $4,7 \pm 0,4$ vs. 90 dias: $5,3 \pm 0,5$) e inverno (30 dias: $6,0 \pm 0,6$ vs. 90 dias: $6,6 \pm 0,6$) (Figura 3a). A média

de ovócitos viáveis por vaca não diferiu entre estações (verão: $3,16 \pm 0,5$ e inverno: $3,14 \pm 0,2$; $P>0,05$), mas durante o inverno a viabilidade foi maior em relação ao verão aos 30 ($3,8 \pm 0,4$ vs. $1,7 \pm 0,3$; $P<0,01$), 60 ($4,0 \pm 0,9$ vs. $2,2 \pm 0,5$; $P<0,05$) e 90 dias pós-parto ($3,1 \pm 0,5$ vs. $1,6 \pm 0,3$; $P<0,05$) (Figura 3b).

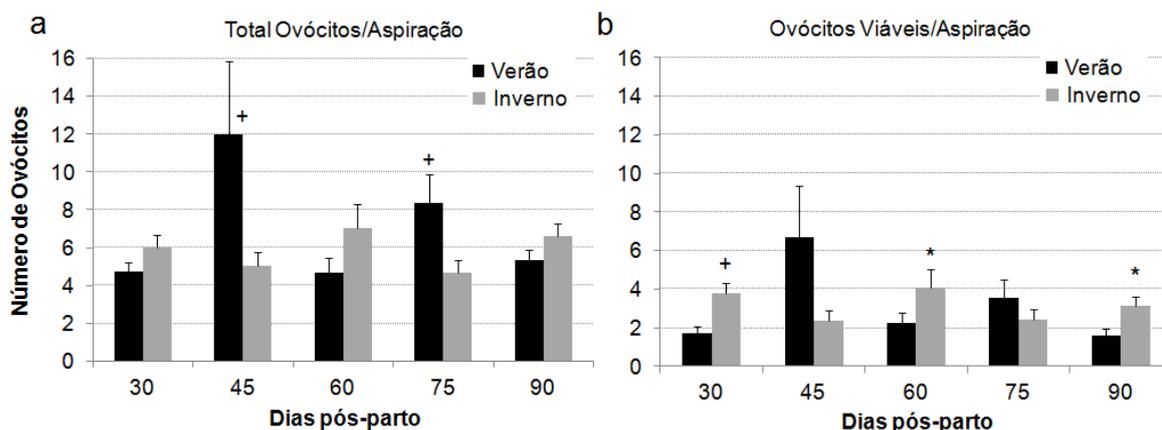


FIGURA 3 - Média \pm (epm) de ovócitos total (a) e viável (b) recuperados de vacas Girolando por sessão de aspiração folicular transvaginal nas estações do verão e inverno entre 30 e 90 dias de lactação. Diferença estatística entre estações para o número de ovócitos obtidos no momento da aspiração folicular transvaginal (* $P<0,05$; + $P<0,01$).

A média de ovócitos qualidade GI e GII por vaca não diferiu ($P>0,05$) entre as estações (Figuras 4ab), porém maior recuperação de ovócitos GIII foi observada durante o inverno ($2,1 \pm 0,2$ vs. $1,9 \pm 0,3$; $P<0,05$), com diferença em relação ao verão aos 30, 45, 60 e 90 dias pós-parto (Figura 4c). A média de ovócitos degenerados (Figura 4d) foi superior durante o verão ($3,9 \pm 0,3$ vs. $2,7 \pm 0,2$; $P<0,01$) e apesar das oscilações observadas para os graus de qualidade (GI, GII, GIII e DEG) entre 30 e 90 dias de lactação, não houve interação entre tempo pós-parto e qualidade do ovócito. Contudo, o efeito estação foi verificado para a média de ovócitos GIII no inverno ($P<0,05$) e ovócitos degenerados no verão ($P<0,01$). Do total de ovócitos obtidos a proporção de GI, GII, GIII e DEG foi de 4,3%, 11,4%, 28,3% e 56,0% para o verão e de 6,8%, 10,1%, 35,6% e 47,5% para o inverno, respectivamente (Figura 5).

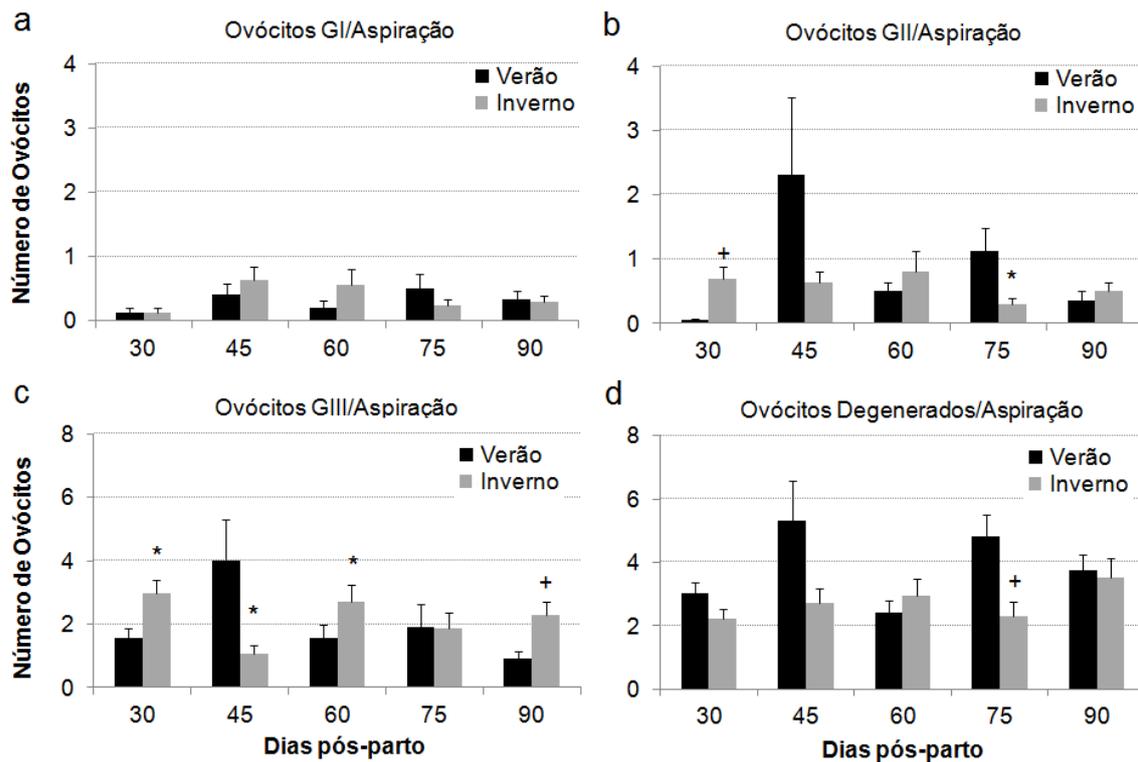


FIGURA 4 - Classificação quanto à qualidade dos ovócitos obtidos (média \pm epm) de vacas Girolando após aspiração folicular transvaginal durante o verão e inverno entre 30 e 90 dias de lactação. (a) ovócitos grau I, (b) ovócitos grau II, (c) ovócitos grau III e (d) ovócitos degenerados. Diferença estatística entre estações para qualidade dos ovócitos obtidos no momento da aspiração folicular transvaginal (^{*}P<0,05; ⁺P<0,01).

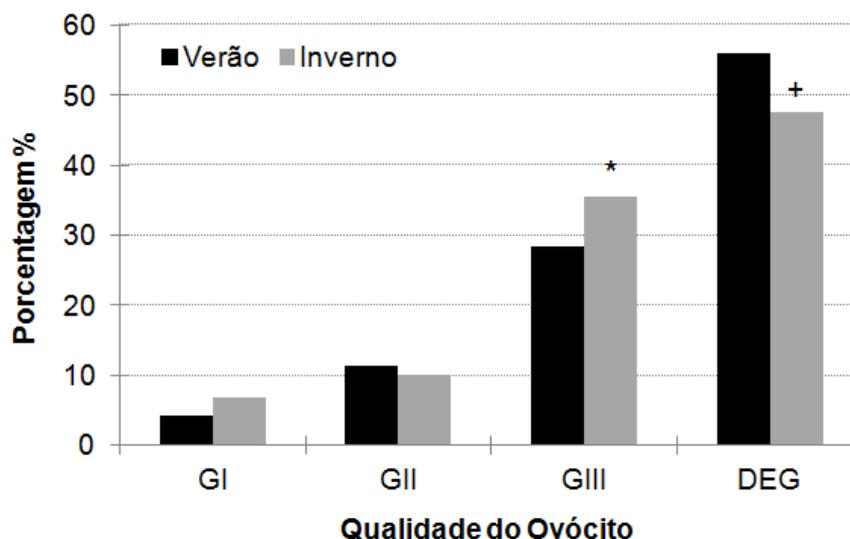


FIGURA 5 - Distribuição da qualidade dos ovócitos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação submetidas à aspiração folicular transvaginal durante o verão e inverno. GI: ovócitos grau I; GII: ovócitos grau II; GIII: ovócitos grau III; DEG: ovócitos degenerados. Diferença estatística entre estações para porcentagem de ovócitos classificados quanto à qualidade (* $P < 0,05$; + $P < 0,01$).

Os metabólitos glicose, ureia, TG, Na, K e Ca no soro e CT, TG, ureia, K e Ca no fluido folicular foram influenciados pela estação do ano (Tabela 2).

TABELA 2 - Efeito da estação (verão e inverno) sobre a concentração média \pm (epm) de metabólitos no soro e fluido folicular de vacas Girolando entre 30 e 90 dias pós-parto

Metabólitos	Soro		Valor P ¹	Fluido Folicular		Valor P ²
	Verão	Inverno		Verão	Inverno	
Glicose (mg/dL)	56,1 \pm 0,7	63,5 \pm 0,9	<0,01	76,1 \pm 2,8	77,1 \pm 1,9	0,78
CT (mg/dL)	136,9 \pm 7,7	129,2 \pm 4,2	0,23	83,3 \pm 4,4	60,7 \pm 3,1	<0,01
TG (mg/dL)	13,3 \pm 0,7	11,3 \pm 0,7	<0,05	22,1 \pm 1,9	14,3 \pm 1,0	<0,01
Ureia (mg/dL)	23,6 \pm 0,9	31,3 \pm 1,5	<0,01	13,3 \pm 0,7	11,2 \pm 0,6	<0,05
Na (mmol/L)	134,4 \pm 1,5	139,2 \pm 2,1	<0,05	221,5 \pm 9,8	206,6 \pm 5,9	0,19
K (mmol/L)	4,3 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	<0,01	4,7 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	<0,01
Ca (mmol/L)	0,8 \pm 0,01	0,6 \pm 0,01	<0,01	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,02	<0,01

CT: colesterol total; TG: triglicérides; Na: sódio; K: potássio; Ca: cálcio.

^{1,2}Valor de P referente à comparação entre estações para concentração média de metabólitos no soro¹ ou fluido folicular².

Os coeficientes de correlação das variáveis clínicas e climáticas com quantificação folicular e qualidade do ovócito estão apresentados na Tabela 3. O total de folículos aspirados foi negativamente associado ($P < 0,01$) com TR ($r = -0,14$), ITU ($r = -0,16$) e UR ($r = -0,18$). O número de ovócitos viáveis apresentou correlação negativa com ITU ($r = -0,19$; $P < 0,01$) e TA ($r = -0,13$; $P < 0,05$) e os ovócitos degenerados associação positiva com ITU ($r = 0,14$; $P < 0,01$) e TA ($r = 0,13$; $P < 0,05$).

TABELA 3 - Coeficientes de correlação (r) das variáveis clínicas (TR, ECC e peso corporal) e climáticas (ITU, TA e UR) com população folicular, número e qualidade de ovócitos obtidos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação

Variáveis	TR	ECC	Peso	ITU	TA	UR
Total Folículo	-0,14**	0,05	0,00	-0,16**	0,07	-0,18**
Folículos 2-4 mm	-0,12*	0,01	-0,07	-0,13**	0,02	-0,11*
Folículos 5-8 mm	-0,04	0,01	0,01	-0,13*	0,09	-0,18**
Folículos ≥ 9 mm	-0,06	0,00	0,05	-0,16**	-0,05	-0,09
Ovócitos Recolhidos	-0,05	0,01	0,00	-0,05	0,02	-0,01
Ovócitos Viáveis	-0,08	0,08	0,07	-0,19**	-0,13*	0,02
Ovócitos Grau I	-0,06	0,03	0,02	-0,06	-0,12*	0,02
Ovócitos Grau II	-0,07	0,04	0,00	-0,14**	-0,11*	0,01
Ovócitos Grau III	-0,05	0,11*	0,07	-0,19**	-0,12*	0,03
Ovócitos DEG	0,00	-0,06	-0,06	0,14**	0,13*	0,01

TR: temperatura retal; ECC: escore de condição corporal; ITU: índice de temperatura e umidade; TA: temperatura ambiente; UR: umidade relativa do ar; DEG: ovócitos degenerados. Valores em negrito são significantes (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Os metabólitos séricos TG ($r=0,11$) e K ($r=0,11$) foram correlacionados positivamente ($P < 0,05$) com número de folículos aspirados. A glicose sérica apresentou associação positiva com número de folículos dominantes ($r=0,13$; $P < 0,05$) e negativa quanto ao número de ovócitos degenerados ($r=-0,12$; $P < 0,05$). Ainda para a presença de ovócitos degenerados foi observada associação negativa com o K ($r=-0,11$; $P < 0,05$) e positiva com o Ca ($r=0,17$; $P < 0,01$), ambos em nível sérico (Tabela 4).

TABELA 4 - Coeficientes de correlação (r) entre metabólitos no soro e população folicular, número e qualidade de ovócitos obtidos de vacas Girolando entre 30 e 90 dias de lactação

Variáveis	Glicose	CT	TG	Ureia	Na	K	Ca
Total Folículo	0,03	0,03	0,11*	0,06	0,05	0,11*	0,04
Folículos 2-4 mm	0,12*	0,02	0,07	0,06	0,00	0,04	0,05
Folículos 5-8 mm	-0,04	0,06	0,06	0,03	0,09	0,18**	-0,02
Folículos ≥ 9 mm	0,13*	0,01	-0,01	0,05	0,00	-0,02	-0,08
Ovócitos Recolhidos	0,05	0,00	0,02	0,02	-0,02	-0,03	0,01
Ovócitos Viáveis	0,06	-0,06	0,03	0,00	-0,02	0,00	0,00
Ovócitos Grau I	0,01	0,03	-0,03	0,04	-0,06	0,00	-0,09
Ovócitos Grau II	0,07	-0,01	0,07	-0,05	0,04	0,04	0,00
Ovócitos Grau III	0,01	-0,06	0,05	0,00	-0,01	0,00	0,00
Ovócitos DEG	-0,12*	0,05	0,06	-0,08	-0,04	-0,11*	0,17**

CT: colesterol total; TG: triglicérides; Na: sódio; K: potássio; Ca: cálcio; DEG: ovócitos degenerados. Valores em negrito são significantes (*P<0,05; ** P<0,01).

3.3 DISCUSSÃO

Nesse estudo foram demonstradas condições desencadeantes ao ET durante a estação do verão, a qual apresentou valores superiores para as variáveis climáticas TA, UR e ITU (Tabela 1) e, em função disso, as vacas avaliadas demonstraram maior perda de escore de condição corporal e temperatura retal elevada, entre 30 e 90 dias pós-parto, em relação ao inverno (Figura 1). A necessidade de energia requerida para manutenção e produção de leite no início da lactação é superior à energia fornecida pela dieta. Essa diferença resulta numa maior mobilização de reservas corporais que associada à diminuição da ingestão de matéria seca, para redução da produção de calor metabólico (WOLFENSON et al., 2000), e a fatores externos como temperatura ambiente, umidade relativa, radiação solar e velocidade do vento, contribuem para o desequilíbrio reprodutivo (DIKMEN & HANSEN, 2009).

O efeito do ET sobre a dinâmica folicular ficou evidente no verão, pois o número de folículos aspirados classificados como pequenos (2-4 mm), médios (5-8 mm) e grandes (≥ 9 mm) foi menor em relação ao inverno. De forma geral, o número de folículos aspirados, independente da classificação, demonstraram correlação negativa com a TR, UR e ITU. Padrões de crescimento folicular são influenciados por mudanças na temperatura corporal e hormônios relacionados ao estresse (hormônio liberador de corticotrofina, peptídeos derivados da pró-ópio-melanocortina) podem influenciar as funções sexuais nos três níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (RIVIER & RIVEST, 1991), inibindo a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio luteinizante (LH) e comprometendo o efeito estimulador das gonadotrofinas sobre a secreção de esteroides sexuais (WOLFENSON et al., 1997; DOBSON & SMITH, 2000; CLARKE & POMPOLO, 2005).

O ET durante o desenvolvimento folicular suprime o crescimento e a ovulação, acompanhado da diminuição do nível de receptores de LH, estradiol e atividade da aromatase nos folículos (OZAWA et al., 2005). A diminuição da concentração de estradiol plasmático e redução do diâmetro folicular foram associadas ao decréscimo da esteroidogênese nas células da granulosa e da teca em vacas lactantes submetidas ao estresse térmico (WILSON et al., 1998).

Os níveis de energia antes e após o parto apresentam influência significativa no tamanho e quantidade de folículos. Quando associado BEN com perda de condição corporal, o crescimento de folículos pequenos até maiores foi suprimido, com diminuição do número total de folículos presentes (PERRY et al., 1991). Entre estações, observamos que a concentração sérica de glicose e o escore de condição corporal foram menores no verão, indicando que durante o pós-parto a dominância folicular pode ser comprometida. Este fato pode ser explicado pela presença de correlação positiva entre os níveis de glicose sérica e número de folículos pequenos (2-4 mm) e grandes (≥ 9 mm). O decréscimo nos níveis de energia reduz a concentração de IGF-I e estrógeno no fluido folicular. As taxas de crescimento diário e total de folículos dominantes são influenciadas pela variação do consumo de energia, sendo positiva para vacas que receberam dietas mais energéticas (KENDRICK et al., 1999).

A média de ovócitos total e viável recuperados por sessão de aspiração não diferiu entre estações (verão vs. inverno) e não foi influenciada pelo tempo pós-parto. Porém, quanto a qualidade, a média de ovócitos GIII foi superior no inverno e o número de ovócitos degenerados maior no verão. Do total de ovócitos recuperados 56% estavam degenerados durante o verão e 47,5% no inverno. Proporcionalmente entre os ovócitos viáveis a maioria foi classificada como GIII (verão 64%; inverno 67%). Estudo recente (MATOBA et al., 2012) não evidenciou o efeito da lactação (até 80 dias pós-parto) sobre a qualidade morfológica e competência de desenvolvimento *in vitro* dos ovócitos de vacas leiteiras. No entanto, mudanças no perfil bioquímico do fluido folicular devido ao ET foram reportadas para as concentrações de glicose, IGF-I, AGNE, ureia e colesterol total, o que pode comprometer o desenvolvimento do ovócito e qualidade das células da granulosa (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2010).

Confirmando o relato anterior, demonstrou-se a associação negativa entre glicose sérica e número de ovócitos degenerados. Ambas variáveis, ITU e TA, apresentaram correlação negativa com o número de ovócitos viáveis e positiva com ovócitos degenerados. Do mesmo modo, verificou-se o efeito da estação sobre as concentrações dos metabólitos no soro para glicose, TG, ureia, Na, K e Ca e fluido folicular para CT, TG, ureia K e Ca.

Alguns estudos reportaram correlação entre as concentrações de metabólitos a nível sérico e folicular, o que pode alterar o microambiente no qual o ovócito se desenvolve. Íons (sódio e cloro) e metabólitos (glicose, CT, TG e ureia) apresentaram forte correlação positiva entre os compartimentos sérico e folicular (LEROY et al., 2004b, JOZWIK et al., 2006), com destaque para a glicose (LEROY et al., 2004a). No fluido folicular os níveis de nutrientes como aminoácidos oscilam de acordo com folículo dominante e fase do ciclo estral, no entanto, a glicose e o piruvato não foram influenciados pela dominância folicular (ORSI et al., 2005). Entretanto, demonstrou-se que além da associação da glicose com número total de folículos e dominância folicular (citados anteriormente), ela apresentou correlação negativa com o número de ovócitos degenerados, interferindo na qualidade ovocitária. PREIS et al. (2005) reportaram que ovócitos de camundongos com grande capacidade de absorção de glicose e conversão em lactato, quando submetidos à maturação *in vitro*, apresentam maior potencial de fertilização. Por outro lado, os metabólitos séricos CT, Na e ureia não apresentaram nenhuma correlação com número de folículos e qualidade ovocitária. Diversos trabalhos demonstraram a relação da ureia com redução do desenvolvimento embrionário *in vitro* (SINCLAIR et al., 2000; DE WIT et al., 2001) e recentemente com a expressão de receptores para IGF-I e insulina no endométrio durante a involução uterina (WATHES et al., 2011). No entanto, outros trabalhos não evidenciaram essa relação (OLIVEIRA et al., 2004; REHAK et al., 2009).

As variáveis metabólicas TG e K no soro apresentaram associação positiva com o total de folículos aspirados. Quanto a qualidade dos ovócitos, o K demonstrou correlação negativa com o número de ovócitos degenerados. Todos os eletrólitos avaliados neste estudo foram influenciados quanto à concentração, em ambos os compartimentos (soro e fluido folicular) pela estação do ano, com exceção para o sódio que sofreu variação apenas em nível sérico. Diferentes proporções de Na/K (16 e 24) foram utilizadas em meios de maturação *in vitro* (IWATA et al., 2004) e não influenciaram a competência ovocitária e a progressão da maturação nuclear. Por outro lado, JIN et al. (1994) relataram taxas superiores de desenvolvimento e eclosão de blastocistos *in vitro*, em camundongos, quando a razão Na/K utilizada foi entre 3 e 10 em relação à proporção de ~ 25, utilizadas

em meios de cultivo e soro. A relação Na/K observada neste estudo no fluido folicular foi de 47 e 48 para o verão e inverno, respectivamente. No entanto, em bovinos ainda não está claro o efeito dessa relação sobre o desempenho reprodutivo de matrizes leiteiras.

Neste estudo as concentrações séricas de Ca apresentaram correlação positiva com o número de ovócitos degenerados. O Ca regula eventos intracelulares importantes relacionados à aquisição da competência meiótica e bloqueio à polispermia (HE et al., 1997). Modificações na regulação de cálcio intracelular ocorrem durante a foliculogênese, com menor concentração de depósitos de cálcio em ovócitos de folículos primordiais em relação a ovócitos de folículos antrais (ROZINEK et al., 2006), e na maturação ovocitária (CARROLL et al., 1994). LEBEDEVA et al. (1998) identificaram o acúmulo de reservas de cálcio intracelular em células da teca e da granulosa de folículos em processo de atresia. Nos bovinos essas alterações associadas com degeneração ocorrem principalmente nas células da granulosa.

3.4 CONCLUSÃO

O estresse térmico e o balanço energético negativo influenciam o perfil metabólico sérico e do fluido folicular, causando efeitos deletérios sobre a foliculogênese, dominância folicular e qualidade ovocitária. As alterações séricas de glicose, triglicérides, potássio e cálcio podem refletir no ambiente folicular, resultando no desenvolvimento de ovócitos morfologicamente comprometidos, ocasionando uma condição de subfertilidade durante o pós-parto.

3.5 REFERÊNCIAS

BILBY, T.R.; GUZELOGLU, A.; MACLAREN, L.A.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, Bovine Somatotropin, and Dietary n-3 Fatty Acids in Lactating Dairy Cows: II. Endometrial Gene Expression Related to Maintenance of Pregnancy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.9, p.3375-3385, 2006.

CLARKE, I.J.; POMPOLO, S. Synthesis and secretion of GnRH. **Animal Reproduction Science**, New York, v.88, n.1-2, 29-55, 2005.

CARROLL, J.; SWANN, K.; WHITTINGHAM, D.; WHITAKER, M. Spatiotemporal dynamics of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. **Development**, Cambridge, v.120, n.12, p.3507-3517, 1994.

DE WIT, A.A.C.; CESAR, M.L.F.; KRUIP, T.A.M. Effect of Urea During In Vitro Maturation on Nuclear Maturation and Embryo Development of Bovine Cumulus-Oocyte-Complexes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.8, p.1800-1804, 2001.

DIKMEN, S.; HANSEN, P.J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.1, p.109-116. 2009.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, New York, v.60-61, p.743-752, 2000.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A. Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.1, p.68-78, 1989.

GWAZDAUSKAS, F.C.; KENDRICK, K.W.; PRYOR, A.W.; BAILEY, T.L. Impact of Follicular Aspiration on Folliculogenesis as Influenced by Dietary Energy and

Stage of Lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.7, p.1625-1634, 2000.

HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, Calcium Release Receptors, and Meiotic Resumption in Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.57, n.5, p.1245-1255, 1997.

IWATA, H.; HASHIMOTO, S.; OHOTA, M.; KIMURA, K.; SHIBANO, K.; MIYAKE, M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v.127, n.2, p.159-164, 2004.

JÓZWIK, M.; JÓZWIK, M.; TENG, C.; BATTAGLIA, F.C. Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. **Human Reproduction**, Oxford, v.21, n.11, p.2776-2782, 2006.

JIN, Z.; JIN, M.; ROOMANS, G.M. Effect of extracellular K⁺ on hatching and outgrowth of mouse blastocysts in vitro. **Cell Biology International**, London, v.18, n.9, p.897-901, 1994.

KENDRICK, K.W.; BAILEY, T.L.; GARST, A.S.; PRYOR, A.W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R.M.; EYESTONE, W.E.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of Energy Balance on Hormones, Ovarian Activity, and Recovered Oocytes in Lactating Holstein Cows Using Transvaginal Follicular Aspiration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1731-1740, 1999.

LEBEDEVA, I.; DENISENKO, Y.; LEBEDEV, V.; KUZMINA, T. Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress. **Theriogenology**, New York, v.49, n.3, p.509-519, 1998.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; DEWULF, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular

fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**, New York, v.62, n.6, p.1131-1143, 2004a.

LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P.E.J.; KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.80, n.3-4, p.201-211, 2004b.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1277-1293, 2001.

MADER, T.L.; DAVIS, M.S.; BROW-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.84, n.3, p.712-719, 2006.

MATOBA, S.; O'HARA, L.; CARTER, F.; KELLY, A.K.; FAIR, T.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.3, p.1257-1266, 2012.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF DAIRY CATTLE. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press; 2001.

OLIVEIRA, M.M.N.F.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P.; CARVALHO, G.R. Ureia para Vacas Leiteiras no Pós-Parto: Teor Plasmático de Ureia e pH Uterino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p.123-127, 2004.

ORSI, N.M.; GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J.; PICTON, H.M.; HARRIS, S.E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, Cambridge, v.129, n.2, p.219-228, 2005.

OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T.A.; SHIMIZU, T.; OSHIMA, I.; KANAI, Y. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, Cambridge, v.129, n.56, p.621-630, 2005.

PERRY, R.C.; CORAH, L.R.; COCHRAN, R.C.; BEAL, W.E.; STEVENSON, J.S.; MINTON, J.E.; SIMMS, D.D.; BRETHOUR, J.R. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.69, n.9, p.3762-3773, 1991.

PREIS, K.A.; SEIDEL Jr, G.; GARDNER, D.K. Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v.130, n.4, p.475-483, 2005.

REHAK, D.; RAJMON, R.; KUBESOVA, M.; STIPKOVA, M.; VOLEK, J.; JILEK, F. Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. **Czech Journal of Animal Science**, Praga, v.54, p.193-200, 2009.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, Madison, v.45, n.4, p.523-532, 1991.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.120, n.1, p.83-90, 2000.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, Cambridge, v.121, n.5, p.745-751, 2001.

ROZINEK, J.; RAJMONA, R.; PETR, J.; ROHLIK, J.; JESETA, M.; SEDMIKOVA, M.; REHAK, D.R.; JILEK, F. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, New York, v.91, n.1-2, p.123-132, 2006.

RUBEL, F.; KOTTEK, M. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v.19, p.135-141, 2010.

SAS - User's Guide: statistics. 5.ed. Cary: SAS Institute, 2000. 1028p

SEWALEM, A.; MIGLIOR, F.; KISTEMAKER, G.J.; SULLIVAN, P.; VAN DOORMAAL, B.J. Relationship Between Reproduction Traits and Functional Longevity in Canadian Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.4, p.1660-1668, 2008.

SHEHAB-EL-DEEN, M.A.M.M.; LEROY, J.L.M.R.; FADEL, M.S.; SALEH, S.Y.A.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early postpartum. **Animal Reproduction Science**, New York, v.117, n.3-4, p.189-200, 2010.

SINCLAIR, K.D.; KURAN, M.; GEBBIE, F.E.; WEBB, R.; McEVOY, T.G. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **Journal of Animal Science**, Columbia, v.78, n.10, p.2670-2680, 2000.

WATHES, D.C.; CHENG, Z.; FENWICK, M.A.; FITZPATRICK, R.; PATTON, J. Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinase expression in the endometrium of the postpartum dairy cow. **Reproduction**, Cambridge, v.141, n.2, p.269-281, 2011.

WILSON, S.J.; MARION, R.S.; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2124-2131, 1998.

WOLFENSON, D.; LEW, B.J.; THATCHER, W.W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.47, n.1-2, p.9-19, 1997.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, New York, v.60-61, p.535-547, 2000.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vacas no início da lactação não consomem quantidade suficiente de nutrientes para suprir as necessidades de produção e manutenção e, frequentemente, encontram-se em balanço energético negativo. Uma perturbação adicional durante este período pode ser causada pelo estresse térmico e, sob esta condição, vacas lactantes reduzem a ingestão de matéria seca ampliando o déficit de energia. No pós-parto, as vacas priorizam a sua energia metabolizável para a produção de leite e, em seguida, para a recuperação da condição corporal. Após estas necessidades imediatas serem cumpridas os processos reprodutivos são retomados. Dessa forma, o desempenho reprodutivo de rebanhos leiteiros está associado ao aumento da produção de leite e a mudanças na fisiologia reprodutiva, tornando-se um problema multifatorial.

Os resultados deste estudo demonstram que os desafios balanço energético negativo e estresse térmico no início da lactação diminuem o escore de condição corporal e alteram as concentrações de glicose, sódio, potássio e cálcio em nível sérico e de colesterol, triglicérides, potássio e cálcio no fluido folicular. Observou-se associação entre as concentrações séricas e do fluido folicular de folículos dominantes para os metabólitos glicose, colesterol total e cálcio, indicando que mudanças metabólicas são refletidas no ambiente folicular podendo comprometer a qualidade do ovócito e das células da granulosa. No fluido folicular o cálcio apresentou correlação positiva com todos os metabólitos analisados, demonstrando sua importância para o ambiente intrafolicular, pois sabe-se que este íon regula eventos intracelulares essenciais para competência ovocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário. Além disso, os dados revelam que as variáveis temperatura retal, estação do ano, ITU, temperatura ambiente, umidade relativa do ar e os metabólitos glicose, triglicérides, potássio e cálcio podem influenciar a foliculogênese, a dominância folicular e a qualidade ovocitária.

Concluindo, esses resultados são importantes para o entendimento da patogênese da subfertilidade que acomete bovinos leiteiros durante o pós-parto e sob condições ambientais desfavoráveis. Este conhecimento deve ser utilizado no

delineamento de novos estudos *in vivo* e *in vitro* sobre problemas de fertilidade com base nos parâmetros metabólicos séricos e do fluido folicular monitorados. Dessa forma, os efeitos deletérios sobre a qualidade do ovócito e do embrião podem ser minimizados pelo monitoramento detalhado do estado de saúde da vaca leiteira e condição corporal nos períodos periparto e pós-parto.