



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
ANIMAL - PPGPA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA
RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO
CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO
CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO**

LUANA COELHO CORTEZ

MOSSORÓ/RN-BRASIL

2012

LUANA COELHO CORTEZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA
RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO
CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO
CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção

Orientador : Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro

MOSSORÓ/RN-BRASIL

2012

LUANA COELHO CORTEZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA
RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO
CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO
CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção

APROVADA EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro
Presidente – Orientador – PPGPA/UFERSA

Prof. Dr. Marcos Antônio Nóbrega de Sousa
Primeiro Membro – Interno – PPGPA/UFERSA

Prof. Dr. Wirton Peixoto Costa
Segundo Membro – Externo – PPGCA/UFERSA

“Dedico à minha querida mãe,
Por todo o carinho e amor
Com o qual cuidou de mim
E de meus irmãos.
E me fez hoje quem sou.”

AGRADECIMENTOS

A Deus por prover, sempre, graças maravilhosas em minha vida.

Aos meus pais Cleiter Batista Cortez e Moema Coelho Cortez. Pelo carinho, amor e dedicação. Ao meu pai pelo exemplo de homem, amoroso, esforçado, trabalhador, não tendo medido esforços para que eu realizasse meu sonho de ser médica veterinária. A minha mãe, pela mulher maravilhosa que é mãe dedicada, esposa querida, amiga verdadeira, obrigada.

Aos meus irmãos, Maria Tereza Coelho Cortez e Cleiter Batista Cortez Júnior e ao meu cunhado Rogério dos Santos Netto pelo apoio e carinho que sempre me proporcionaram mesmo a distância. E aos meus queridos sobrinhos João Pedro e Rafael.

À minha avó Teresa da Silva Coelho pelo carinho, exemplo de matriarca que nos faz orgulhosos. Por sempre estarem torcendo por mim. Vovó, obrigada.

Aos meus avós paternos Isaura Batista Cortez (*in memorian*) e Olivier Dantas Cortez (*in memorian*) por estarem sempre me iluminando. Dona Isaura, uma mulher iluminada cujo exemplo nos faz seguir sempre. Sabendo do grande homem que foi meu avô o qual passou sua vida lidando com animais, hoje estará muito orgulhoso de ter uma neta Médica Veterinária. E ao meu avô materno, José Pady Coelho, que transmitia sua força e coragem, me fazendo sentir uma grande pessoa apesar de ser uma simples garotinha na época em que pude estar ao seu lado, obrigada.

À Sebastiana Macedo de Jesus por ter sido como uma mãe para mim e me amado como tal, bem como a Aparecida da Silva por ter me ajudado muito e a todos da minha casa.

Ao meu Orientador, o Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro, pelo incentivo, paciência e orientação para a realização deste trabalho.

Ao Prof.Msc. Leonardo Lelis pela contribuição na realização do meu experimento, estendendo-se a todos os membros do laboratório.

Aos melhores colegas de turma do mestrado, Dinnara Silva, Dowglish Ferreira, Jacinara Hody, Joélina Santuza, José Maria Freire, Karla Priscilla de Oliveira, Vanessa Vieira Chaves, Susana de Medeiros Matos e Ana Luiza Cazaux, pelo companheirismo e amizade dedicados à mim durante todo o período de mestrado.

A todos que compõem o setor da bovinocultura da Ufersa, Oséas Pereira de Oliveira, Francisco Bernardino dos Santos, Adriano Pereira de Oliveira e Alderi Pereira de Oliveira, Sr. Souza, pelo auxílio durante todo o desenrolar do meu experimento sem o qual não conseguiria concluí-lo. Obrigada.

A todos os tios, tias, meus padrinhos e familiares que através de suas orações, incentivos cheguei ao termino de mais uma etapa da minha vida.

Às minhas amigas, Adriana Sidon, Anne Maia Lopes e Roseane Marques. Obrigada pela amizade de vocês.

A todos os professores que me ajudaram na conclusão deste curso, passando seus ensinamentos.

Agradeço ao CNPQ pelo financiamento do projeto científico que desenvolvi. Edital MTC/CNPq nº14/2010-Universal no valor de R\$19.623,73 reais.

Agradeço à CAPES pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Agradeço à UFERSA e a todos que direta e indiretamente contribuíram na realização de mais um sonho. Obrigada!

EFEITO DO ESTRESSE POR CALOR NA REPRODUÇÃO DA FÊMEA BOVINA

RESUMO: Visando elevar os índices de produtividade do rebanho brasileiro instaurou-se a inserção de características de animais especializados oriundos de regiões do planeta predominantemente frias através da aquisição de animais ou do uso de biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões. Como resultado, obtemos animais que não podem expressar seu potencial produtivo de forma plena, pois não possuem total condicionamento fisiológico para viverem em ambiente predominantemente estressante por calor, devido às altas temperaturas médias encontradas nas regiões próximas aos trópicos. O presente estudo tem como objetivo discorrer sobre os efeitos das altas temperaturas sobre a reprodução de fêmeas bovinas, especificamente relacionada à atividade folicular ovariana e embrionária.

Palavras-chave: bovino, estresse térmico, desenvolvimento embrionário, reprodução.

EFFECT OF HEAT STRESS ON FEMALE BOVINE REPRODUCTION

ABSTRACT: In order to raise productivity levels of Brazilian herd it was implemented insertion of specialized features of animals from specific cold regions of the world predominantly through the acquisition of animals or the use of biotechnologies such as artificial insemination and embryo transfer. As result, we obtain that animals cannot express their fully productive potential, because they don't have the required physiology to overcome a predominantly stressful conditions due to higher average temperatures found in regions close to the tropics. The present study aimed to discuss the effects of high temperatures on cow's reproduction, specifically related to ovarian follicular activity and embryo.

Keywords: cattle, heat stress, embryonic development, reproduction.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO

Luana C. Cortez^b, Luiz A. V. Cordeiro^a.

^aDepartamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 59.625-900, Brasil

^bMestranda em Produção Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 59.625-900, Brasil

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito do estresse térmico sobre a quantidade e qualidade de embriões de vacas holandesas criadas no semiárido nordestino submetidas à superovulação. Mensurou-se a frequência respiratória (FR, movimentos/minuto), temperatura retal (TR, °C) e de superfície corpórea (TS, °C) dos animais durante a realização experimento, em condição de sombreamento artificial e sob luz solar incidente; avaliação de condições ambientais: temperatura do ar, umidade relativa e temperatura de globo negro nos dois ambientes experimentais. Dosagens séricas de hormônios tireoidianos e cortisol, exame ultrassonográfico para avaliar dimensão ovários e seus folículos. Após aplicação de protocolo hormonal de superovulação e inseminação artificial, foi feita coleta e feita avaliação estereomicroscópica da morfologia dos embriões coletados. As condições ambientais verificadas caracterizaram um ambiente possivelmente estressante para os animais de ambos os grupos. Os parâmetros fisiológicos mensurados apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, mais elevadas nos animais expostos ao sol em comparação aos animais confinados em sombra, queda de T3 e T4 e aumento do Cortisol, no intuito de diminuir a geração de calor endógeno. Não houve diferenças significativas quanto a dimensão ovariana e folicular, nem número de embriões, entretanto, apenas as doadoras expostas ao sol apresentaram embrião do tipo Não fecundado, e maiores médias de embriões com degeneração, sugerindo que a condição de estresse ambiental por luz solar intensa tenha influenciado a baixa qualidade desses embriões.

Palavras-chaves: bovino, estresse por calor, protocolo hormonal, embrião.

QUALITY ASSESSMENT OF EMBRYOS OF HOLSTEIN COWS IN SHADE AND CONTINUOUS EXPOSURE TO THE SUNLIGHT IN SEMIARID CLIMATE AND SUBMITTED TO SUPEROVULATION.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effect of heat stress on the quantity and quality of embryos of Holstein cows submitted to superovulation raised in the northeast semiarid. Was measured the respiratory rate (RR, movements / min), rectal temperature (RT, ° C) and body surface (TS, ° C) while conducting animal experiments, in conditions of artificial shading and sunlight incidence; assessment of environmental conditions: air temperature, relative humidity and black globe temperature in the two experimental environments. Serum thyroid hormones and cortisol, ultrasound to assess ovarian size and their follicles. After inducing hormonal superovulation and artificial insemination, measurements were made and subsequently stereomicroscopic assessment of the collected embryos morphology. The surrounding environment condition featured a possible stressful environment for the animals in both groups. Physiological parameters measured showed significant differences between the experimental groups, higher in animals exposed to sunlight as compared to animals confined in the shadow, fall of T3 and T4 and increased cortisol, in order to reduce endogenous heat generation. There were no significant differences in the ovarian and follicular size, or number of embryos, however, only donors exposed to sunlight had fertilized non embryo type, and higher average embryo degeneration, suggesting that the condition of environmental stress by great sunlight exposure have influenced the low quality of these embryos.

Keywords: cattle, heat stress, hormonal protocol, embryo.

LISTA DE TABELAS

- Tabela A** - Valores das doses de Cipionato de Estradiol, (E.C.P.®, Pfizer, Animal Health, Brasil), FSH (Foltropin-V®, Vetrepharm Inc./Tecnopec), Cloprostenol (Ciosin® – Schering-Plough do Brasil) e aplicação de dispositivo de progesterona de liberação lenta (CIDR®, Pfizer, Animal Health, Brasil), de acordo com o dia e o horário experimental.... .37
- Tabela B** - Média geral \pm desvio padrão para variáveis meteorológicas durante o período experimental.....37
- Tabela C** - Resumo da análise de variância de frequência respiratória (FR, m.p.m.), temperatura retal (TR, °C), temperatura de superfície (TS, C°), e dos níveis circulantes de Triiodotironina (T3, pg/ml), Tiroxina (T4, ng/dL), Cortisol(ng/ml), das vacas Holandesas criadas no setor de bovinocultura da UFERSA, Mossoró- RN.....38
- Tabela D** -Variação das médias gerais frequência respiratória (FR, m.p.m.), temperatura retal (TR, °C), temperatura de superfície (TS, C°), e dos níveis circulantes de Triiodotironina (T3, pg/ml), Tiroxina (T4 , ng/dL), Cortisol (ng/ml), das vacas Holandesas criadas no setor de bovinocultura da UFERSA, Mossoró- RN.....38

LISTA DE FIGURAS

- Figura A.1** Valores das médias gerais de diâmetro de Folículos ovarianos (mm) e Ovários (mm) experimental ao qual pertenciam as vacas doadoras, vacas estabuladas à sombra (GRUPO 1= Grupo sombreamento) e vacas expostas ao sol (GRUPO 2= Grupo ao SOL).....39
- Figura A.2** Porcentagem de embriões coletados classificados como Não fecundados (NF), Mórula (MO), Mórula Compacta (MC) e Blastocisto (BL) de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam as vacas doadoras, vacas estabuladas à sombra (GRUPO 1= Grupo sombreamento) e vacas expostas ao sol (GRUPO 2= Grupo ao SOL).....39
- Figura A.3** Grau de degeneração dos embriões, porcentualmente, de acordo com o número de embriões coletados de cada grupo experimental, em que D1= degeneração de até 30%; D2= de 40 a 60 % de degeneração; D3= de 70 a 90% de degeneração; D4 para 100% de degeneração e TOT= porcentagem geral de embriões degenerados por grupo experimental.....40

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO.....	27

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O ESTRESSE TÉRMICO EM BOVINOS

Grande parte do território brasileiro está situado na faixa tropical do planeta, onde predominam elevadas temperaturas e alta radiação. Mais de 60% da pecuária bovina no mundo se dá na região tropical. Entretanto, a produtividade animal é menor que a encontrada nas regiões temperadas, com lentas taxas de crescimento e reduzida produção de leite (BACCARI JR., 1990), além de queda na eficiência reprodutiva dos bovinos, tendo como possíveis causas do rendimento produtivo o baixo valor nutritivo das pastagens, as doenças e parasitas e o estresse pelo calor (TIZIKARA, 1985).

A temperatura ambiente representa a principal influência climatológica sobre as variáveis fisiológicas como temperatura retal e frequência respiratória, seguida, em ordem de importância, pela radiação solar, a umidade relativa do ar e o movimento do ar. Os fatores abióticos devem ser associados às análises das condições de manejo e das características particulares de cada animal ou rebanho (espécie, raça, idade, sexo, estado fisiológico) que, juntos, podem vir a interferir nos padrões de comportamento, favorecendo situações de estresse (GRANT & ALBRIGHT, 1995), ou, caso os mecanismos de termólise sejam acionados de maneira eficiente, os animais possam manter a homeotermia. (SILVA, 2008).

A temperatura de conforto é aquela na qual se torna dispensável qualquer atividade metabólica por parte do animal para aquecer ou esfriar o corpo, na qual o metabolismo animal é mínimo (OLIVEIRA et al., 2003), para bovinos da raça Holandesa, os limites térmicos ambientais da zona de conforto variam de -1°C a 21°C , o de termoneutralidade situa-se em 27°C , e o limite de umidade relativa ideal para animais domésticos varia de 60 a 70% enquanto a referência fisiológica, sob mensuração da temperatura retal, para bovinos, varia de $38,1^{\circ}\text{C}$ a $39,1^{\circ}\text{C}$ para animais das raças de corte especializadas, de $38,0^{\circ}\text{C}$ a $39,3^{\circ}\text{C}$ para animais leiteiros (ROBINSON, 2004). Os bovinos dissipam calor para o ambiente através da pele por radiação, condução e convecção, considerados perda de calor sensível (CUNNINGHAM, 1999).

Estão expostos a este estresse, animais acomodados em local cuja temperatura ambiente estiver acima da zona de conforto térmico e for gasta energia para manutenção da temperatura corporal, as perdas de calor sensíveis são diminuídas e aumenta o resfriamento por evaporação, por sudorese, por ofego, ou ambos. Este resfriamento evaporativo é o único processo de perda de calor disponível quando a temperatura ambiente excede a temperatura da pele (ROBINSON, 2004).

O estresse térmico ou calórico altera a apresentação de eventos reprodutivos uma vez que afeta a expressão de comportamento de estro, altera o desenvolvimento folicular e inibir o desenvolvimento embrionário (HANSEN et al., 2001).

1.2 ESTRESSE TÉRMICO E DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

A vaca pertence às espécies poliéstricas, de tipo estral contínuo. A duração média do ciclo é de 21 dias, o cio é de curta duração, em média de 14 a 15 horas, e a ovulação que é espontânea, sobrevêm de 10 a 14 horas após o fim do cio. O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados e pelo ovário. Um componente conhecido como tendo importante influência é o hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH). O crescimento folicular, em bovinos, ocorre em ondas sucessivas, durante as quais há o estabelecimento e posterior atresia de um folículo dominante (FIGUEIREDO et al., 1995).

O folículo ovariano é uma estrutura que sofre uma profunda mudança por todo o ciclo estral. Com o crescimento folicular, antes da ovulação, dois tipos de células podem ser identificados cercado o ovócito: células da granulosa que formam a camada interior circundando o ovócito e as células da teca que formam a camada exterior (LAMARRE et al., 1999) e sua regressão folicular é caracterizada por separação de células da granulosa da parede do folículo interno e sua liberação subsequente dentro do antro.

O folículo pré-ovulatório é um componente chave no sistema reprodutivo sendo as taxas de concepção em vacas de leite inversamente relacionadas à temperatura ambiente durante a fase folicular. O estresse térmico diminui a seleção dos folículos e longevidade da onda folicular e, desta forma, potencializa efeitos adversos sobre a qualidade dos folículos e estereoidogênese. O estresse térmico nos períodos de verão reduzem o grau de dominância do folículo dominante e folículos de tamanho médio

acabam por se manter e prevalecer. Assim, a duração da dominância dos folículos pré-ovulatórios aumenta no verão e, em vacas de corte, a duração da dominância tem efeito negativo sobre a fertilidade. Quando a dominância folicular individual é reduzida, mais do que um folículo podem se desenvolver e tornarem-se dominantes, fato que pode explicar a ocorrência em maior intensidade de partos gemelares durante o verão no hemisfério norte. Desta forma, o estresse térmico pode ao mesmo tempo diminuir a secreção de estrógeno folicular e aumentar a ocorrência de partos gemelares (DE RENSI; SCARAMUZZI, 2003).

1.3 DESENVOLVIMENTO INICIAL DO EMBRIÃO SOB ESTRESSE TÉRMICO

O oócito maduro precisa passar por vários processos para dar origem a um embrião capaz de concluir seu desenvolvimento. Entre tais processos se inclui a aquisição de proteínas receptoras de espermatozóide e de moléculas sinalizadoras no ooplasma para permitir a fertilização, o acúmulo de reservas intracelulares de cálcio, execução do bloqueio à polispermia, maturação nuclear com segregação correta dos cromossomos, a aquisição de agentes redutores e outras moléculas necessárias para a descondensação dos pronúcleos, o desenvolvimento do sistema citoesquelético necessário para a singamia e a síntese e o armazenamento do RNA mensageiro, de proteínas e de outras moléculas necessárias para auxiliar no desenvolvimento antes da implantação. Qualquer falha em um ou mais processos acima descritos pode levar a bloqueios na aquisição de competência e não geração do embrião (HANSEN, 2002). Para ser bem sucedido em seu desenvolvimento um embrião deve ajustar sua fisiologia em resposta aos sinais maternos e a outras mudanças no ambiente uterino, como aumento de temperatura, mudanças de pH, hipoxia. As células do *cumulus*, que circundam o oócito no momento da ovulação têm um papel crucial estimulando a síntese de antioxidantes pelos oócitos e protegendo-os contra altas temperaturas (EDWARDS & HANSEN, 1996).

Experimentos com camundongos mostram que o ET reduz as concentrações intracelulares de glutathiona (GSH), um tripeptídeo com ação antioxidante, que neutraliza os radicais livres (ARECHIGA et al., 1995). A administração de substâncias antioxidantes (vitamina E e selênio) aos animais sob ET apresentou efeitos positivos nos níveis de fertilidade de vacas normotérmicas (ARECHIGA et al., 1998).

Um fenômeno bastante comum em embriões sob ET é a ocorrência de apoptoses, que é a morte programada de células, mecanismo pelo qual o embrião elimina células que estão danificadas, degeneradas ou anormais. Em embriões em estágio de 16 células, no dia quatro pós-fertilização, o choque térmico aumenta o percentual de células que sofrem apoptose. Contrariamente o ET não aumenta o número de células apoptóticas nos estágios de duas a oito células (HANSEN, 2004). Ainda de acordo com ele, existem duas possibilidades que podem explicar porque os embriões se tornam mais termotolerantes conforme se desenvolvem: a primeira é a de que um embrião mais desenvolvido, com mais células, apresenta menor comprometimento em sua sobrevivência do que aqueles com menor número de células. Considerando a ocorrência de apoptoses, por exemplo, em um embrião de duas células, poderia comprometer a viabilidade deste embrião, enquanto sua ocorrência quando este se encontra na fase de mórula ou blastocisto teria percentualmente um menor número de células afetadas. A segunda possibilidade é a de que o embrião adquire durante seu desenvolvimento mecanismos de termoproteção, como a produção de proteínas do choque térmico (HSP). Embriões produzidos através da fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Brahman com sêmen de touro da raça Angus foram mais resistentes ao ET que embriões produzidos pela fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Holandesa com sêmen de touros da raça Angus. Entretanto, não houve diferença com relação à resistência ao ET para embriões Brahman x Holandês e Angus x Holandês. Estes resultados indicam que a contribuição do oócito pode ser mais importante do que a do espermatozóide na capacidade dos embriões Brahman resistirem aos efeitos do estresse térmico. (BLOCK et. al., 2002).

De maneira geral, o estresse térmico (ET) atua negativamente no embrião de várias formas, seja pela formação de radicais livres ou peróxidos, ou pela indução exagerada de apoptoses celulares (HANSEN, 2002). Durante os primeiros dias de fecundação os embriões são mais susceptíveis ao ET, enquanto se tornam mais resistentes a partir de 16 células (terceiro a quarto dia;), provavelmente devido à indução da síntese de proteínas de ET (HSP70 e 90), que atuam de forma a proteger o embrião estabilizando suas estruturas protéicas e RNA ribossomal (EDWARDS & HANSEN, 1997) para impedir apoptoses, ou outras moléculas antioxidantes, como a glutatona (ROCHA et al., 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARECHIGA, C.F.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation mouse embryos. **Biol. Reprod.**, v.52, p.1296-1301, 1995.

ARECHIGA C.F., STAPLES, C.R., McDOWELL, L.R., HANSEN, P.J. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.390-402, 1998.

BACCARI JR., F. Métodos e técnicas de avaliação da adaptabilidade dos animais às condições tropicais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL NOS TRÓPICOS: PEQUENOS E GRANDES RUMINANTES, 1986, 1., Fortaleza. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DIE, 1990. p.9-17. (EMBRAPA-CNPC. Documentos, 7).

BLOCK, J.; CHASE, C.C.; HANSEN, P.J.; Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p.32-7, 2002.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**.2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.454.1999.

DE RESIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and sazonal effects on reproduction in the dairy cow – a reiew. **Theriogenology**, v.60 p.1139-1151, 2003.

EDWARDS J.L., HANSEN P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev**, v.46, p.138-45, 1997.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol. of Reprod.**, v.55, p.340-6, 1996.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; ROCHA, G. P.; PAPA, F. O. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 3 – 4, p. 200 – 211, 1995.

GRANT, R.J., ALBRIGHT, J.L. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.2791-2803, 1995.

HANSEN, P.J.; DROST, M.; RIVERA, R.M. Adverse impact of heat stress of embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, p.91-103, 2001.

HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **J. Anim. Sci.**, v.80, E. Suppl. 2, p.E33-E44, 2002.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.83-84, p.349-60, 2004.

LAMARRE, J.; GENTRY, P. A.; FORBES, M.; SCHROEDER, M. Novel regulatory mechanisms in bovine ovarian folliculogenesis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 4, p. 564 – 565. Out. /Dez., 1999.

. OLIVEIRA, P. A. V.; PAULO, R. M.; TINÔCO, I. F. F. Efeito da temperatura no desempenho zootécnico de suínos em crescimento e terminação nos sistemas de camas sobrepostas e piso concretado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, X., 2003. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, p. 401, 2003.

ROBINSON, N.E. Homeostase – Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 579- 550. 2004.

ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-65, 1998.

SILVA, R. G. **Biofísica Ambiental**: os animais e seu ambiente. São Paulo: FUNEP, 450p. 2008.

TIZIKARA, C.; AKINOKUN, O.; CHIBOKA, O. A review of factors limiting productivity and evolutionary adaptation of tropical livestock. **World Review of Animal Production**, v.21, n.4, p.41-46,1985.

2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE EMBRIÕES DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA SOB SOMBREAMENTO E EXPOSIÇÃO CONTÍNUA AO SOL SUBMETIDAS À SUPEROVULAÇÃO CRIADAS EM CLIMA SEMIÁRIDO

Formato da revista: Hormones and Behavior Journal
www.elsevier.com/locate/yhbeh

INTRODUÇÃO

O estresse térmico (ET) pode ser definido como a somatória de forças externas ao animal homeotérmico que atuam de forma a alterar a temperatura corporal do estado de repouso. Em ambientes de temperaturas elevadas, nas quais a produção de calor excede a dissipação pelos animais, todas as fontes que geram calor endógeno são inibidas, principalmente o consumo de alimento e o metabolismo basal e energético, enquanto a temperatura corporal, a frequência respiratória e a taxa de sudorese aumentam. As alterações dos parâmetros indicam tentativas do animal de minimizar o desbalanço térmico para manter a homeotermia (SOTA et al., 1996). De acordo com Lee et al. (1974) a temperatura ambiente representa a principal influência climatológica sobre as variáveis fisiológicas, temperatura retal e frequência respiratória, seguidas, em ordem de importância, pela radiação solar, a umidade relativa do ar e o movimento do ar. Também têm sido objeto de estudo os constituintes sanguíneos (BIRGEL JÚNIOR et al., 2001). Sob altas temperaturas, especialmente na fase aguda do estresse por calor, ocorre a redução na concentração dos hormônios tireoideanos (Tiroxina e triiodotironina) na tentativa de diminuir a produção de calor endógena (McNABB, 1995), e elevação da concentração sanguínea de Cortisol (RUCKEBUSCH et al., 1995), modificando a função endócrina (HANSEN, 2009).

Os animais doadores de embriões devem ser mantidos em ambiente climatizados, não havendo interferência do calor no desenvolvimento do oócito, assim, embriões transferidos para vacas receptoras no 7º dia após o estro já passaram em condição confortável pelo período mais sensível do desenvolvimento (EALY et al., 1993; EDWARDS & HANSEN, 1997). Caso essa situação de conforto térmico não seja garantida, o estresse calórico pode atuar negativamente no embrião de várias formas, seja pela formação de radicais livres ou peróxidos, ou pela indução exagerada de apoptoses celulares, (EDWARDS et al., 2001, PAULA-LOPES & HANSEN, 2002), reduzindo a taxa de sucesso da biotécnica.

São observados efeitos diretos sobre o oócito (ROTH e HANSEN, 2004) e o índice de mortalidade embrionária aumenta quando os animais são expostos a altas temperaturas (MASSEY et al., 1984; SHEA et al., 1984), além de qualidade ser inferiorizada (de CASTRO e PAULA e HANSEN, 2008). Ainda assim, há a

necessidade de estudos aprofundados que ofereçam maior consistência aos anteriores. Este trabalho, portanto, objetiva estudar a influência do calor sobre a produção embrionária de vacas holandesas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas vinte fêmeas bovinas da raça Holandesa Branca e Preta criadas no Setor Didático de Bovinocultura Leiteira (5° 12' 32.03'' de latitude e 37° 18' 59.38'' de longitude) do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em Mossoró- RN, alimentadas com volumoso, sal mineral e água *ad libitum* e ração comercial concentrada do cocho .

Formou-se dois grupos experimentais diferentes entre si apenas pela forma de confinamento, sendo o grupo 1 (n=10) com vacas mantidas em estábulos individuais de sombreamento artificial, uso de aspersores e livre espaço para circulação de ar e no grupo 2 (n=10), as vacas permaneciam em piquetes descobertos para receber luz solar incidente durante todo o dia. Um período de adaptação aos ambientes experimentais de 20 dias foi instaurado antes do início do experimento. Estabeleceu-se um único tratamento hormonal de superovulação para ambos os grupos experimentais (tabela A). O dia inicial de tratamento foi chamado dia Zero (Dia 0 = início), com a administração de 1 ml Cipionato de Estradiol, (E.C.P.®, Pfizer, Animal Health, Brasil), numa concentração de 2mg/ml, por via intra-muscular-IM, e de dispositivo intravaginal liberador de progesterona de forma lenta (CIDR®, Pfizer, Animal Health, Brasil), numa concentração de 1,9 g de progesterona. Por conseguinte, nos 5° e o 8° dias de tratamento (do Dia = 5 ao Dia = 8), a cada 12 horas, às 7 e às 19 horas foram administradas doses decrescentes diariamente na proporção $\frac{1}{4}$, de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), (Foltropin-V®, Vetrepharm Inc./Tecnopec), frasco de liofilizado contendo 400mg de NIH-FSH-P1 e 1 frasco com 20ml de diluente.

No 8° dia (Dia = 8) foi retirado o dispositivo intravaginal e administrada prostaglandina (PGF₂α) sintética, cloprostenol (Ciosin ® 0,530 mg/ml – Schering-Plough do Brasil) na dose de 2ml, por via IM, às 7 e às 19 horas, para melhor efeito de sincronização, visando regredir o corpo lúteo cíclico. No 10° dia (Dia = 10) foram realizadas duas inseminações artificiais em tempo fixo (IATF), de acordo com

Reichenbach et al. (2002), com sêmen de touro holandês branco e preto, cerca de 48 e 72 horas respectivamente, após a primeira dose de prostaglandina. No momento anterior à primeira inseminação artificial por tempo fixo, foi realizado o exame ultrassonográfico por via transretal com o aparelho Honda Diagnostic Scanner HS-1500 (Honda Electronics Co., LTD; Medical Division, Toyohashi, Japão), utilizando sonda de 5 Hz de frequência, para detectar ovulação e estimar as dimensões de ovários e folículos dominantes.

Foi coletado sangue de todas as vacas, após antissepsia do local com álcool iodado, através de punção da venosa caudal, retirando-se uma amostra de 10 ml de sangue, utilizando o sistema a vácuo, em tubos de vidro siliconizados sem anticoagulante, no dia inicial do experimento (Dia = 0) e no momento da IATF (Dia = 10), as amostras foram centrifugadas, imediatamente, a 3.000 rotações por minuto (r.m.p.) durante dez minutos e o soro armazenado em microtubos do tipo “ependorf” e congelado a -20°C , para posteriores dosagens de Tiroxina (T_4 Livre), triiodotironina (T_3 Livre), Cortisol, pelo método ELISA, no Laboratório do Núcleo de Estudo de Pesquisa em Pequenos Ruminantes na UFERSA.

No décimo sétimo dia (Dia = 17), os embriões foram coletados através do método transcervical de colheita de embriões, acordo com Gambarini (2004), e imediatamente classificados, de acordo com este mesmo autor, em: mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, através de visualização por Microscópio de lentes invertidas, na escala de aumento de 40 vezes. Ainda foi mensurado grau de degenerações e número de não fertilizados.

Foram avaliadas variáveis fisiológicas: frequência respiratória (movimentos/minuto), temperatura retal (TR , $^{\circ}\text{C}$), e temperatura de superfície (T_s $^{\circ}\text{C}$), e ambientais: temperatura do ar (t_a , $^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (U_R , %), e temperatura de globo negro em ambos ambientes experimentais. Os animais passaram por um dia de coletas consecutivas a cada 1 hora, de todos estes parâmetros fisiológicos e paralelamente os de ambientais (abióticos), durante um dia todo, das 7 às 17 horas, além de coletas diárias durante todo o período experimental.

Na análise estatística foram realizadas análises de variância e teste de Tukey a 1 % de significância, por meio do programa estatístico SAS, versão 6.12 (SAS, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os valores das variáveis ambientais correspondentes às médias registradas durante todos os dias experimentais, percebe-se que o ambiente apresentou elevada temperatura do ar, caracterizando, possivelmente, um ambiente estressante aos animais (Tabela B).

Pôde-se observar que a temperatura média ambiental, bem como suas amplitudes máximas foram superiores à temperatura de 26°C, considerada limite crítico por Berman et. al. (1985) em relação à ocorrência de estresse por calor em vacas da raça holandesa. Em vacas leiteiras, a temperatura ambiente é um importante fator determinante para a sua performance reprodutiva. (BETTY et. al., 2006), ao trabalharem com bovinos taurinos e índicos, saindo de clima temperado para clima quente do oriente médio, observaram que o gado *Bos taurus* sofreu significativas alterações fisiológicas durante exposição prolongada e contínua a altas temperaturas e umidade, com alterações que persistiram ainda por alguns dias após a melhora nas condições de estresse por calor enquanto o gado *Bos indicus* sofreu alterações fisiológicas menos pronunciadas.

Houve diferença significativa para todos os parâmetros fisiológicos e hormonais analisados, exceto o cortisol, (Tabela C).

As médias gerais dos parâmetros foram avaliadas (Tabela D). As médias de frequência respiratória (FR) foram elevadas, estando acima do considerado normal para vacas adultas, que gira em torno de 24 movimentos/ minuto, em condições de conforto térmico de acordo com Randall et. al., (1997). Os valores de temperatura retal se encontraram dentro da normalidade de 38,0°C a 39,3°C, para animais leiteiros (ROBINSON et. al., 2004). Os animais pertencentes ao grupo experimental expostos à radiação solar (GRUPO 2) apresentaram médias superiores tanto para frequência respiratória como para temperatura retal, indicando que estes tiveram maior necessidade de dissipar calor, através da evaporação respiratória. Devido a incidência solar direta, a temperatura de superfície média dos animais expostos ao sol (GRUPO 2) foi 3,72 °C maior que a dos animais estabulados (GRUPO 1), vindo ao encontro com o exposto por Navarini et. al, (2009), que se tratando de diferentes condições de sombreamento natural e exposição solar direta de gado Nelore, obteve uma diferença de temperatura de superfície de 0,9°C entre animais expostos sol e um dos tratamentos de sombreamento.

Souza et. al., (2007), analisando bovinos da raça Sindi criados extensivamente no semiárido Paraibano, obteve valores médios de temperatura retal de 38,9°C e frequência respiratória de 35 movimentos/minuto em época seca, e temperatura de superfície de 33,1 °C em época chuvosa. Em resumo, foi valor bastante significativo por se tratar de média e de animais homeotérmicos, que usam mecanismos naturais para regular sua temperatura corpórea.

A mensuração destes hormônios como indicadores de estresse pelo calor, facilita a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos nos processos de termólise e homeotermia (STARLING et al., 2005). Hormônios tireoidianos circulam na corrente sanguínea quase que totalmente ligados às proteínas plasmáticas, apenas 0,02% da Tiroxina (T4) e 0,2% da Triiodotironina (T3), entretanto suas as concentrações livres são tão relevantes quanto as do hormônio total, pois o hormônio livre é o hormônio biologicamente ativo. Além disso, as várias alterações nas proteínas transportadoras (adquiridas ou herdadas) alteram as concentrações séricas do T4 e do T3 total, independente do status tireoidiano (MCDONALD & PINEDA,1989). Os valores séricos de Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) encontraram-se mais baixos do que o visto por FAÇANHA-MORAIS et. al., 2008), que avaliando a variação desses hormônios em vacas leiteiras em clima quente, encontraram médias para T3 total de 1,05 ng/ml e para T4 total de 6,02 µg/dl, considerados dentro da faixa da normalidade. Zambrano & Marques Jr., (2009) ao estudar o perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras do pré-parto ao quinto mês da lactação, obteve média para tiroxina livre (T4) de 5,37±1,69 pmol/l considerando-o baixo quando comparado com os valores encontrados na literatura. Como os hormônios tireoidianos estimulam a termogênese em vários tecidos, provavelmente, animais menos adaptados podem utilizar esta alternativa fisiológica de diminuir a secreção de T3 e T4 para reduzir a produção de calor endógeno, na tentativa de se ajustar ao ambiente quente (FAÇANHA-MORAIS et. al., 2008). Nesta mesma tentativa, os animais desse experimento apresentaram elevação da concentração sanguínea de cortisol, corroborando com o encontrado por Starling (2005), que encontraram maiores médias de cortisol nas épocas de primavera e verão, correlacionando-as com elevação da temperatura e alta umidade, o que correspondeu a um aumento no desconforto térmico dos animais por dificultar o processo de termólise.

Os valores de diâmetro folicular (mm), diâmetro ovariano (mm), número de embriões não diferiram significativamente entre os grupos analisados de acordo com o

Teste Tukey. (figura A.1.) Shehab-El-Deen et. al., (2010) estudando animais da raça holandesa de alta produção leiteira, em época de inverno e verão, no período pós-parto, perceberam que o estresse térmico diminuiu o valores de escore corporal e o diâmetro de folículo dominante, além de alterar as concentrações bioquímicas no fluido celular do folículo dominante, podendo resultar em baixa qualidade dos oócitos e de células da granulosa e, portanto, baixa fertilidade. Silvestre et. al, (2009), observaram que no verão, folículos ovarianos desenvolviam-se com maior índice de danos, quer seja para os de maior dimensão (dominantes), quer sejam os menores, se comparado aos meses mais frios, pois folículos ovarianos são susceptíveis ao estresse calórico (BADINGA et al.,1993).

Embora pareça que a habilidade da superovulação das vacas estressadas pela temperatura elevada não se altere (PUTNEY et. al., 1988), temperatura acima de 32°C pode aumentar a quantidade de embriões retardados (PUTNEY et al.,1989). O número de embriões de categoria Mórula e Mórula compacta foi o mesmo para ambos os grupos (Figura A.2), entretanto os não fertilizados apareceram somente nas doadoras pertencentes ao grupo de animais expostos ao sol (GRUPO 2) e o maior número de embriões na forma de blastocisto, com maior número de células, se deu no grupo de animais estabulados à sombra (GRUPO 1). Foi realizada uma classificação geral dos embriões de acordo com seus níveis de degeneração (Figura A.3), variando de até 30%, de 40 a 60%, 70% a 90% e 100% de degeneração. Percentualmente, os embriões das vacas criadas em condições de sombreamento (GRUPO1) apresentaram mesmo número de embriões com o menor grau de degeneração (até 30%) ao se comparar com animais expostos ao sol (GRUPO 2). Em contrapartida, este último obteve mais embriões em degeneração mais avançada, de 40 a 60% e de 70 a 90% do total do embrião. As vacas do GRUPO 1 não apresentaram embriões com 70 a 90% de degenerações, e para embriões totalmente degenerados, a percentagem entre grupos foi a mesma. No total, entre embriões com algum grau de degeneração a maior parte foram provenientes de vacas expostas ao sol (GRUPO 2).

Assim como nesse estudo, (WANG et. al, 2011) avaliando o desenvolvimento de oócitos e blastocistos de 7 dias, in vitro, concluíram que ovários armazenados a temperatura de 35°C originaram menor número de oócitos, blastocistos de menores números de células e maior apoptoses e degenerações do que os ovários mantidos a temperaturas de 25 e 15°C. Corroborando com os anteriores, Di Francesco et. al, (2011),

também com o objetivo de avaliar a influência da época do ano na taxa de recuperação de oócitos, na qualidade dos ovócitos, através da morfológica, e capacidade de desenvolvimento após fertilização in vitro de embriões bubalinos, obtiveram oócitos menores nas épocas quentes, assim como uma maior taxa de clivagem e de embriões nas épocas mais frias do ano. Ainda, (KRININGER et. al, 2003) após analisarem a formação de embriões no calor de vacas das raças Brahman e Holandesas, encontraram embriões de Brahman sofreram clivagem mais cedo, sugerindo a diferença entre as raças, entretanto, exposição do embrião de 2-4 células ao calor de 41°C por 4,5h reduziu a proporção de embriões que se desenvolveram a blastocisto, igualmente em ambas as raças.

CONCLUSÃO

As condições ambientais verificadas juntamente ao acionamento de um conjunto de mecanismos fisiológicos termorregulatórios promoveram um ambiente possivelmente estressante para os animais de ambos os grupos. Os parâmetros fisiológicos mensurados apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, mais elevadas nos animais expostos ao sol em comparação aos animais confinados em sombra, queda de T3 e T4 e aumento do Cortisol, no intuito de diminuir a geração de calor endógeno. Não houve diferenças significativas quanto a dimensão ovariana e folicular, nem número de embriões, entretanto, apenas as doadoras expostas ao sol apresentaram embrião do tipo Não fecundado, e maiores médias de embriões com degeneração, sugerindo que a condição de estresse ambiental por luz solar intensa tenha influenciado a baixa qualidade desses embriões.

Este ambiente influenciou negativamente a qualidade dos embriões produzidos por estas vacas, gerando oócitos não fecundados, pouco desenvolvidos e com degenerações, o que, de modo geral, compromete a eficiência reprodutiva desses animais. Assim, medidas de promoção de conforto térmico, como o sombreamento, podem ser importantes aliadas da elevação da performance reprodutivas do gado holandês leiteiro na região semiárida nordestina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Badinga, L.; Thatcher, W.W.; Diaz, T.; Drost, M.; Wolfenson, D., 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactation Holstein cows. *Theriogenology*, 39:797-810.

Beatty, D. T.; Barnes, A.; Taylor, E.; Pethick, D.; Mccarthy, M.; Maloney, S. K., 2006. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.* v. 84, p. 972- 985.

Berman, A.; Folman, Y.; Kaim, M., 1985. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yield dairy cows in a subtropical climate. *Journal of Dairy Science*, v.68,n.6, p.1489-2432.

Birgel júnior,E.H.;D Angelino,J. L.; Benesi, F. J., 2001. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 164-171.

de Castro e Paula, L.A., Hansen, P.J., 2008. Modification of actions of heat shock on development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration and dithiothreitol. *Mol. Reprod. Dev.* v.75, p.1338-1350.

Di Francesco, S.; Boccia, L.; Campanile, G.; Di Palo, R.; Vecchio, D.; Neglia, G.; Zicarelli, L.; Gasparrini, B., 2011. *Animal Reproduction Science*. v. 123, p. 48–53.

Early, A.D., Drost, M., Hansen, P.J., 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2899-905.

Edwards, J.L., Hansen, P.J., 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, v.46, p.138-45.

Edwards, J.L.; King, W.A.; Kawarsky, S.J.; Ealy, A.D., 2001. Responsiveness of

early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, v.55, p.209-223.

Façanha-morais, D. A. E; Maia, A. S. C; Silva, R. G; Vasconcelos, A. M; Lima, P. O; Guilhermino, M. M., 2008. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 37, n. 3, p. 538-545.

Gambarini, M. L. M., 2004. Curso de transferência de embriões em bovinos. Goiânia:UFG.

Krinninger III, C. E.; Block, J.; Al-Katanani, Y. M.; Rivera, R.M.; Chase jr., C.C.; Hansen, P. J., 2003. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Animal Reproduction Science* . v.78, p. 13-24.

Hansen, P.J. (2009) Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos T R Soc B* v.364, p.3341-3350.

Lee, J. A.; Roussel, J. D.; Beatty, J. F., 1974. Effect of temperature season on bovine adrenal cortical function, blood cell profile, and milk production. *Journal of Dairy Science*, Cambridge, v. 59, n. 1, p. 104-108.

Massey, J.M., Oden, A.J., 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the Southwest region of the USA. *Theriogenology*, v.21, p.196-217.

Mcdonald, L. E. and M. H. Pineda. 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fourth ed. Lea and Febiger., p. 561-585.

McNabb, A.F.M., 1995. Thyroid hormones, their activation, degradation and effects on metabolism. In: conference metabolic modifiers, Amsterdam.

Navarini, F. C.; Klosowski, E. S.; Campos, A. T.; Teixeira, R. A.; Almeida, C. P., 2009. Conforto térmico de bovinos da raça nelore a pasto sob diferentes condições de sombreamento e a pleno sol. *Eng. Agríc.*, Jaboticabal, v.29, n.4, p.508-517.

Paula-lobes, F.F., Hansen, P.J., 2002. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. *Biol. Reprod.*, v.66, p.1169-77.

Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W., 1989. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, v.31, p.765-778.

Putney, D.J., Thatcher, W.W., Drost, M., 1988. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the Southwest region of the United States. *Theriogenology*, v.30, p.905-922.

Robinson, N.E., 2004. Homeostase – Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 579-550.

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

Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L. P.; Dunlop, R., 1995. *Physiology of small and large animals*. Philadelphia. Decker, p. 513- 520.

Silvestre, F. T.; Kamimura, S.; Arteché, A. C.; Bartolome, J.; Pancarci, S. M.; Thatcher, W. W., 2009. Reproductive responses following postpartum suppression of ovarian follicular development with a deslorelin implant during summer heat stress in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*. v. 111, p. 320–337.

SAS Institute. *SAS/STAT. User's Guide: Statistics*, 1998. Ver. 6.12. 4th ed. Cary. P. 842.

Shea, B.F., Jansen, R.E., McDermand, D.P., 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology*, v.21, p.186-195.

Shehab-el-deen ,M.A.M.M.; Leroy ,J.L.M.R. ; Fadel, M.S.; Saled ,S.Y.A.; Maes, D.; Soom, V. A., 2010. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. *Animal Reproduction Science*, v. 117, p.189-200.

Sota, R. L. de la; Risco, C. A.; Moreira, F., 1996. Efficacy of a timed insemination program in dairy cows during summer heat stress. *Journal Animal Science*, Champaign, v. 74, p. 133, 1996. Supplement 1.

Souza, B. B. de; Silva, R. M. N. da.; Marinho, M. L.; Silva, G. de A.; Silva, E. M. N da.; Souza, A. P. de., 2007. Physiological parameters and heat tolerance index of sindi breed bovine in the semi-arid of Paraíba. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 31, n. 3, p. 883-888.

Starling, J. M. C.; silva, R. G.; Negrão, J. A.; Maia, A. S. C.; Bueno, A. R., 2005. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.6, p. 2064-2073.

Y.S. Wanga,,Y.S.; X. Zhaoa,X.; J.M. Sua, J. M., Z.X. Na Z. X., X.R. Xiong,X. R.; L.J. Wang, L. J.. Liu,J.; F.S. Quan,F. S.; Hua, S.;. Zhang.,Y., 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer *Animal Reproduction Science*. v.124, p. 48–54.

Zambrano, W. J.; Marques Jr,A. P., 2009. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras no pré-parto ao quinto mês da lactação. *Zootecnia Tropical*, v.27, ed.4, p. 475-488.

APÊNDICE

Tabela A- Valores das doses de Cipionato de Estradiol, (E.C.P.®, Pfizer, Animal Health, Brasil), FSH (Foltropin-V®, Vetrepharm Inc./Tecnopec), Cloprostenol (Ciosin® – Schering-Plough do Brasil) e aplicação de dispositivo de progesterona de liberação lenta (CIDR®, Pfizer, Animal Health, Brasil), de acordo com o dia e o horário experimental

Dia experimental/ horário (horas)	Droga administrada e doses
Dia 0 (7 horas)	1 ml (E.C.P.®) + (CIDR®- implante)
Dia 5 (7 horas)	4 ml (Foltropin-V®)
Dia 5 (19 horas)	4 ml (Foltropin-V®)
Dia 6 (7 horas)	3 ml (Foltropin-V®)
Dia 6 (19 horas)	3 ml (Foltropin-V®)
Dia 7 (7 horas)	2 ml (Foltropin-V®)
Dia 7 (19 horas)	2 ml (Foltropin-V®)
Dia 8 (7horas)	1 ml (Foltropin-V®) + 2 ml (Ciosin®)
Dia 8 (19 horas)	1 ml (Foltropin-V®) + 2 ml (Ciosin®)

Tabela B- Média geral \pm desvio padrão para variáveis meteorológicas durante o período experimental

Variável	Média \pm Desvio Padrão	Mínima	Máxima
Tar	31,59 \pm 2,55	25,6	37,9
UR	51,90 \pm 9,65	28,5	69,8
GNsombra	32,98 \pm 2,46	26,3	39,3
Gsol	39,04 \pm 5,04	27,2	50,3

Tar- temperatura do ar; UR- Umidade relativa do ar; GNsombra- temperatura de globo negro à sombra (°C), GNsol-temperatura de globo negro ao sol (°C)

Tabela C Resumo da análise de variância de frequência respiratória (FR, m.p.m.), temperatura retal (TR, °C), temperatura de superfície (TS, C°), e dos níveis circulantes de Triiodotironina (T3, pg/ml), Tiroxina (T4 , ng/dL), Cortisol(ng/ml), das vacas Holandesas criadas no setor de bovinocultura da UFERSA, Mossoró- RN

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		FR	TR	TS	T3	T4	Cortisol
Grupo	1	9182,60**	8,26**	1420,15**	131.29**	5,82**	4607,81 ^{ns}
Média geral		57,76	38,26	36,84	22,72	3,16	57,07
CV (%)		25,55	1,08	8,79	15,89	24.36	56,94
R ²		0,095	0,10	0,24	0,61	0,60	0,40

** (P<0,01); ^{ns} Não Significativo (P>0,05). Grupo é o efeito dos animais dentro dos ambientes experimentais. GL= Grau de liberdade.

Tabela D Variação das médias gerais frequência respiratória (FR, m.p.m.), temperatura retal (TR, °C), temperatura de superfície (TS, C°), e dos níveis circulantes de Triiodotironina (T3, pg/ml), Tiroxina (T4 , ng/dL), Cortisol (ng/ml), das vacas Holandesas criadas no setor de bovinocultura da UFERSA, Mossoró- RN.

Grupos	Parâmetros					
Experimentais	FR	TR	TS	T ₃	T4	Cortisol
GRUPO 1	51.65	38.08	34.48	25.80	3.93	64.57*
GRUPO 2	61.47	38.37	38.20	20.09	2.87	69.48*

Média seguidas por asterisco na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância; GRUPO 1 = vacas estabuladas à sombra; GRUPO 2 = vacas expostas ao sol

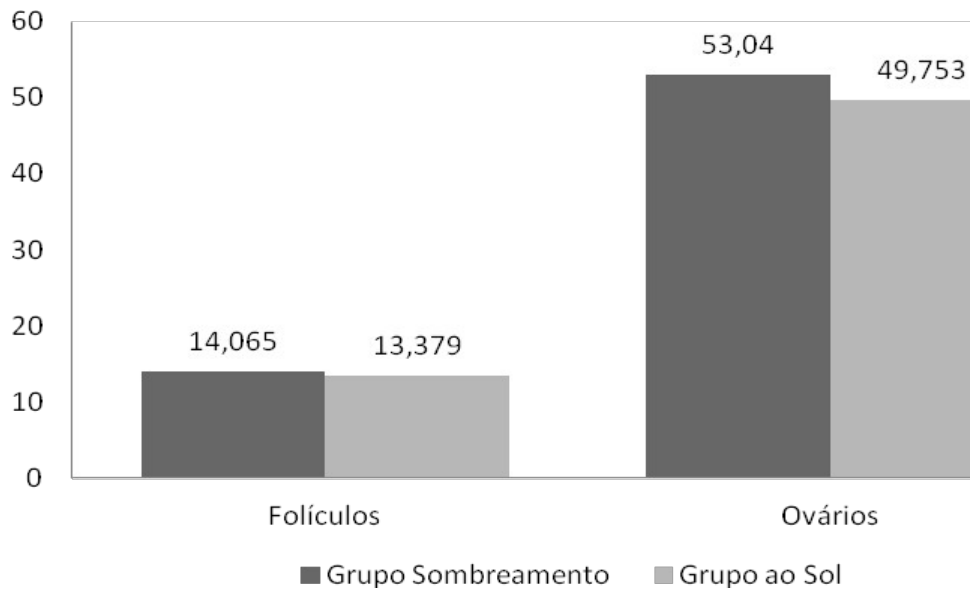


Figura A.1 Valores das médias gerais de diâmetro de Folículos ovarianos (mm) e Ovários (mm) experimental ao qual pertenciam as vacas doadoras, vacas estabuladas à sombra (GRUPO 1= Grupo sombreamento) e vacas expostas ao sol (GRUPO 2= Grupo ao SOL) . Não houve diferença significativa ao Teste de Tukey.

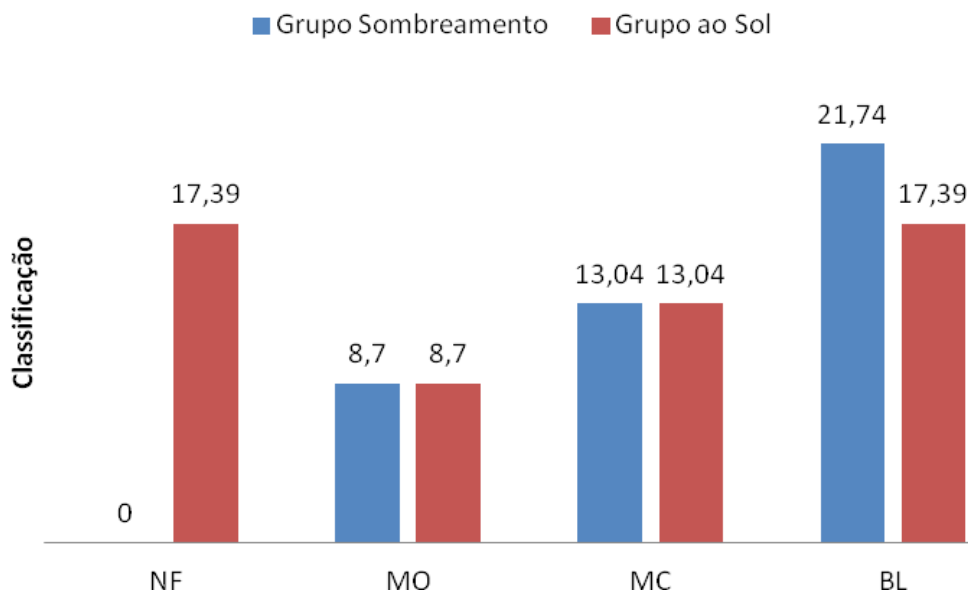


Figura A.2 Porcentagem de embriões coletados classificados como Não fecundados (NF), Mórula (MO), Mórula Compacta (MC) e Blastocisto (BL) de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam as vacas doadoras, vacas estabuladas à sombra (GRUPO 1= Grupo sombreamento) e vacas expostas ao sol (GRUPO 2= Grupo ao SOL) . Não houve diferença significativa ao Teste de Tukey.

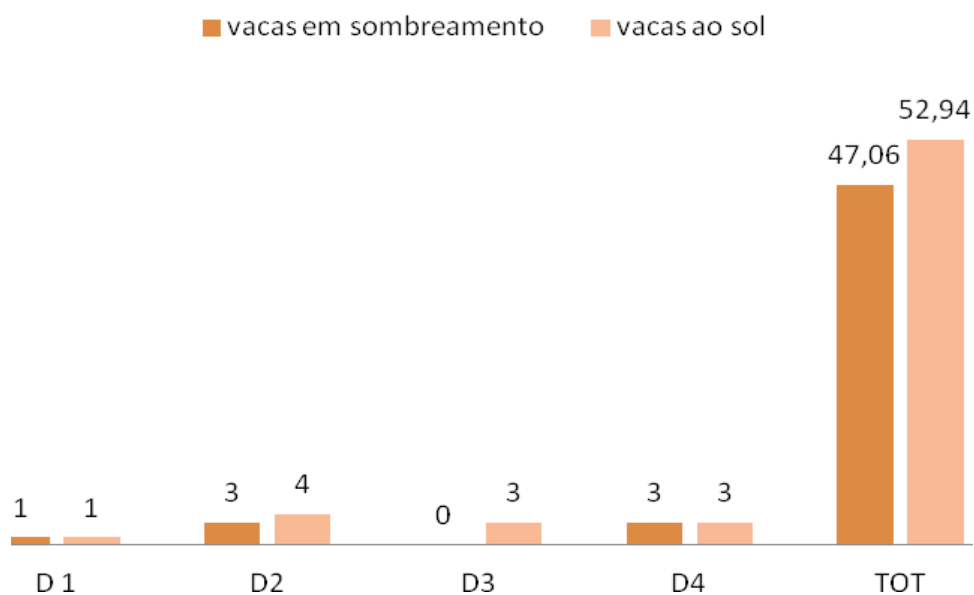


Figura A.3 Grau de degeneração dos embriões, porcentualmente, de acordo com o número de embriões coletados de cada grupo experimental, em que D1= degeneração de até 30%; D2= de 40 a 60 % de degeneração; D3= de 70 a 90% de degeneração; D4 para 100% de degeneração e TOT= percentagem geral de embriões degenerados por grupo experimental. . Não houve diferença significativa ao Teste de Tukey.

NORMAS DA REVISTA

Article structure

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and Methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. The types of statistical tests used to analyze the data should be clearly specified.

Results Results of statistical tests should be clearly presented.

Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of no more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the

following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of

electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Cover artwork. Authors are encouraged to submit photos or other artwork associated with their article for possible use on the cover of the issue of *Hormones and Behavior* in which the article appears. The author whose artwork is chosen for the cover receives a gratis issue.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

References should provide a context for the new results being presented while giving proper attribution to relevant, prior research on the topic.

The name and date system should be used for citing all references. All citations in the text should refer to:

1. Single author: The author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication.
2. Two authors: Both authors' names and the year of publication.
3. Three or more authors: First author's name followed by et al. and the year of publication.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown. . . ."

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

All author names should be given; do not use et al in the reference list.

Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus.

Please note the following examples:

Degroot, L. (Ed.), 1989. *Endocrinology*. Saunders, Philadelphia.

Fleming, A.S., Corter, C., Stallings, J., Steiner, M., 2002. Testosterone and prolactin are associated with emotional responses to infant cries in new father. *Horm. Behav.* 42, 399-413.

McEwen, B.S., Sakai, R.R., Spencer, R.L., 1993. Adrenal steroid effects of the brain: versatile hormones with good and bad effects. In: J. Schulkin (Ed.), *Hormonally Induced Changes in Mind and Brain*. Academic Press, New York, pp. 221-365.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be

embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
 - Full postal address
 - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
 - All figure captions
 - All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
 - Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
 - References are in the correct format for this journal
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at http://nl.sitestat.com/elsevier/elsevier-com/s?clickout.elsevier.rightnow.support&ns_type=clickout.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- Double-space
- Line numbering
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- Authors need to submit their papers including double-space and line numbering.
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes