

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Efeitos do estresse térmico sobre parâmetros fisiológicos e vascularização de estruturas ovarianas em animais com valores genéticos distintos para termotolerância – resultados preliminares¹

Humberto José F. Costa², Gilson Gonçalves Maia³, Luiz Sérgio A. Camargo⁴, Luiz Gustavo B. Siqueira⁵

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: (a) Parte do projeto Associação de marcadores genéticos e fenotípicos de termorregulação a parâmetros reprodutivos (02.14.08.003.00.03), liderado por Luiz Sérgio de Almeida Camargo; (b) Parte da dissertação de mestrado de Gilson G. Maia, financiada pela Embrapa, (c) Bolsista da Capes.

²Graduando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. E-mail: betofcosta2011@yahoo.com.br

³Mestrando, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. E-mail: gilsonmaia@yahoo.com.br

⁴Pesquisador do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Email: luiz.camargo@embrapa.br

⁵Orientador, Pesquisador do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Email: luiz.siqueira@embrapa.br

Resumo: Os parâmetros fisiológicos e reprodutivos de bovinos sofrem influencia das elevadas temperaturas e umidade relativa do ar existentes em regiões tropicais. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do estresse por calor sobre parâmetros fisiológicos (temperatura vaginal-TVg., frequência respiratória-FR e frequência cardíaca-FC), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistência (IR) arterial, bem como a vascularização de folículos pré-ovulatórios e do corpo lúteo (CL) de vacas Girolando não lactantes, previamente classificadas como resistentes ou sensíveis ao estresse térmico. Vinte vacas multíparas foram estabuladas em câmara climática (índice de temperatura e umidade – ITU médio=83,13) ou em galpão *freestall* (ITU médio=66,51), distribuídas aleatoriamente em delineamento experimental crossover. As vacas foram alimentadas para manutenção com silagem de milho *ad libitum* e 1,0 kg/dia de concentrado. Ultrassom Doppler foi utilizado para avaliar IP/IR de artéria íliaca interna e o grau de vascularização de folículos pré-ovulatórios e do CL. Os dados foram analisados por Anova com o PROC GLM para medidas repetidas no tempo, utilizando o software SAS. O estresse por calor aumentou TVg ($P<0,05$) e FR ($P<0,001$) em animais estabulados na câmara climática, enquanto a FC não foi afetada pelo estresse térmico nos dias de avaliação, ($P>0,05$). O estresse por calor não afetou valores de IP e IR da artéria íliaca interna ($P>0,05$) assim como não afetou o tamanho ou fluxo sanguíneo de folículos pré-ovulatórios ($P>0,05$). Contudo, a área do CL no dia 10 do ciclo estral foi maior em animais termotolerantes não submetidos ao estresse térmico (grupo *freestall*) comparados com animais classificados como termosensíveis (4,5 vs 3,18 cm²; respectivamente; $P=0,024$) e o fluxo sanguíneo do CL tendeu a ser menor em animais alocados na câmara climática, sob estresse por calor, independentemente de serem termotolerantes ou não (0,86 vs 0,58 cm²; *freestall* vs câmara, respectivamente; $P=0,08$). Conclui-se que o ITU elevado altera os parâmetros fisiológicos temperatura corporal e FR, não afeta o diâmetro e o fluxo sanguíneo de folículos pré-ovulatórios, mas reduz o fluxo sanguíneo do CL em vacas Girolando não lactantes. Ainda, animais termotolerantes tiveram maior área de CL em ambiente sem estresse térmico comparados com termosensíveis.

Palavras-chave: Doppler colorido, estresse térmico, bovino

Effects of thermal stress upon physiological parameters and vascularization of ovarian structures in animals with distinct breeding values for thermotolerance

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of heat stress upon physiological parameters (vaginal temperature- VgT, respiratory-RR and heart-HR rates), arterial pulsatility and resistance index (PI/RI), as well as vascularization of the pre-ovulatory follicles and corpus luteum (CL) in Girolando cows previously classified as resistant or sensible to heat stress. Multiparous cows (n=20) were housed in a climate chamber (average THI=83.13) or in a *freestall* barn (average THI=66.51), randomly distributed in a crossover design. Cows were fed corn silage *ad libitum* and 1 kg per day of concentrate. Doppler ultrasound

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

was used to evaluate PI and RI and vascularization of pre-ovulatory follicles and the CL. Data was analyzed by ANOVA using the PROC GLM for repeated measures, using the SAS software. Heat stress increased VgT ($P<0.05$) and RR ($P<0.001$) in animals kept in the climate chamber, whereas heart rate was not affected by heat stress ($P>0.05$). Heat stress also did not affect PI and RI of the internal Iliac artery ($P>0.05$) as well as the size nor vascularization of pre-ovulatory follicles ($P>0.05$). Nonetheless, CL area at day 10 of the cycle was greater in thermotolerant animals not submitted to heat stress (freestall group) compared with sensible females (4.5 vs 3.18 cm²; respectively; $P=0.024$) and blood flow to the CL tended to be lower in females allocated in the climate chamber, under heat stress, independent of being thermotolerant or not (0.86 vs 0.58 cm²; freestall vs chamber, respectively; $P=0.08$). We conclude that high THI alters the physiological parameters body temperature and RR, do not affect the diameter nor the vascularization of preovulatory follicles, but reduce blood flow to the CL in Girolando cows. Yet, thermotolerant females had a greater CL area in an non-stress environment compared to sensible animals.

Keywords: color Doppler, heat stress, bovine.

Introdução

O Brasil é um país que apresenta climas variados em sua vasta extensão. Sendo assim, parte do rebanho bovino sofre estresse por exposição ao calor, em especial com relação a seus parâmetros reprodutivos. O efeito causado pelas elevadas temperatura e umidade atmosféricas é uma das causas de prejuízo na produção de leite e na fertilidade de bovinos, principalmente no verão de regiões tropicais e subtropicais. Por exemplo, no sul do Piauí foi observada uma queda de 24% na produção de leite em animais mestiços Holandês x Gir quando expostos por 1h a irradiação solar com índice de temperatura e umidade (ITU) de 70 (Dias e Silva e De Sousa Júnior, 2013). Ainda, vacas inseminadas no outono e inverno tem maiores taxa de concepção do que fêmeas inseminadas nos meses de primavera e verão (SILVA et al., 2018).

Para contornar este problema, produtores das regiões mais quentes do país utilizam bovinos de raças mestiças, oriundas de cruzamentos, que apresentam maior resistência ao calor. Em relação às alterações de parâmetros reprodutivos, estudos que associam vascularização de folículos pré-ovulatórios e subsequente fertilidade são raros e inconclusivos (Siddiqui et al., 2009) e não há estudos associando estresse por calor com características vasculares e morfológicas do CL em bovinos. Neste contexto, este estudo avaliou vacas Girolando sob condições de ITU elevadas a fim de identificar alterações em parâmetros fisiológicos [temperatura vaginal (TVg), frequência respiratória (FR) e frequência cardíaca (FC), índice de pulsatilidade (IP) e índice de resistência (IR) de artéria Iliaca interna] e reprodutivos (área e vascularização do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo).

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco – MG, região caracterizada por Clima subtropical úmido com inverno seco e verão quente – Cwa em escala Koppen-Geiger, durante o período de junho de 2018 a outubro de 2018. Foram utilizadas 20 vacas Girolando, com cio sincronizado, de diferentes graus de sangue, classificadas geneticamente a partir de uma regressão aleatória como termotolerantes ($n=10$) ou termosensíveis ($n=10$). Foi utilizado delineamento crossover e arranjo dos tratamentos em fatorial 2x2, composto por dois ambientes (câmara climática = estresse por calor versus *freestall* = termoneutralidade, sem estresse por calor) e dois grupos de animais (termotolerante versus termosensíveis). A ordem de exposição aos tratamentos foi designada aleatoriamente para cada animal. Um grupo foi mantido em câmara climática sob estresse por calor (ITU elevado) enquanto o outro grupo permaneceu em galpão tipo *freestall*, sob ITU ameno. O experimento foi realizado em quatro repetições, de 25 dias consecutivos de avaliação, seguidos de 28 dias de descanso entre repetições. As trocas de temperaturas e umidades diárias no interior da câmara climática mimetizaram uma curva de um dia comum segundo Rhoads et al. (2009), com três diferentes Índices de Temperatura e Umidade (ITU) em um período de 24 h = 74.8 de 00:00h até 10:00h; ITU = 88.6 de 10:01h até 18:00h; e ITU = 79.7 de 18:01 até 23:59h, com 12h de luz e 12 h de escuro. O ITU foi calculado de acordo com Dikmen et al. (2014) segundo a fórmula: $ITU = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26)]$, onde T = temperatura de bulbo seco (°C) e RH = umidade relativa (%). Foram coletados dados fisiológicos tais quais frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

vaginal (TVg). Os dois primeiros foram aferidos diariamente com ajuda de estetoscópio às 8h e 16h e a temperatura vaginal foi aferida com o uso de termômetros automáticos do tipo data logger (iBottom®, iBottomLink LLC, Whitewater, WI, USA) programados para coletar a temperatura a cada hora e mantidos em cada animal com o auxílio de dispositivos intravaginais conforme descrito por Dikmen et al. (2014), sendo introduzidos no primeiro dia de cada repetição e permaneceram até o fim de cada período de avaliação e coleta de dados. As estruturas ovarianas foram avaliadas por meio de ultrassonografia modo B para determinar tamanho (diâmetro folicular e área do CL) e modo Doppler colorido para avaliação do fluxo sanguíneo (vascularização) nestas estruturas. Para a análise estatística, foram realizados testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, seguidos de análise por Anova para avaliação de FC, FR, TVg, IP, IR, diâmetro e fluxo sanguíneo do folículo no dia da ovulação, e área e fluxo sanguíneo do corpo lúteo no dia 10 após a ovulação, considerando dois ambientes (*freestall* versus câmara climática) e dois tipos de animais (termotolerantes versus termosensíveis). O valor de $P=0,05$ foi adotado para determinar diferença estatística.

Resultados e Discussão

Dentre os parâmetros fisiológicos avaliados, o estresse por calor aumentou ($P<0.05$) consistentemente FR e TVg em animais mantidos sob ITU elevado na câmara climática, em comparação com ambiente de ITU ameno (*freestall*, Figura 1A e 1B). A FC não foi afetada pelo estresse por calor, demonstrando que os animais desenvolvem mecanismos de compensação para que não seja alterada a função cardíaca, mesmo com aumento de frequência respiratória e temperatura corporal.

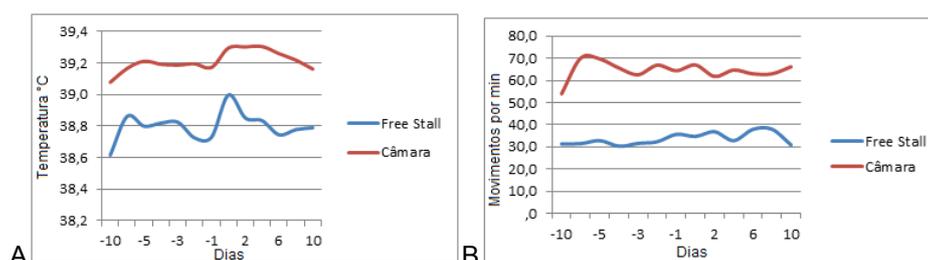


Figura 1. Médias de temperatura vaginal (TVg; A) e frequência respiratória (FC; B) em animais mantidos sob estresse por calor (câmara climática) versus ambiente termoneutro (*freestall*).

Os IP e IR não mostraram alterações significativas no padrão de fluxo sanguíneo da artéria lílaca, assim como não foram observados efeitos do estresse por calor sobre o diâmetro e vascularização do folículo pré-ovulatório (Tabela 1; $P>0.05$). Foi observada uma tendência de animais sob estresse térmico (câmara climática) terem um menor grau de vascularização (fluxo sanguíneo) no CL no dia 10 do ciclo estral (Tabela 1), porém o tamanho do CL não foi afetado.

Tabela 1. Efeitos do estresse térmico por calor sobre o tamanho e vascularização de estruturas ovarianas em vacas Girolando.

Estruturas ovarianas	Freestall (termoneutro)	Câmara (estresse térmico)	Signif. (P)
Diâmetro Folículo ovulatório (mm)	16,1	13,5	0,17
Vascularização Folículo ovulatório (cm ²)	0,18	0,20	0,78
Área do CL (cm ²)	3,68	3,47	0,53
Vascularização do CL (cm ²)	0,86 ^a	0,58 ^b	0,08

Considerando a classificação de animais termotolerantes, estes apresentaram maior área do CL quando alocado no ambiente termoneutro em comparação com animais termosensíveis (4,47 versus 3,18 cm², respectivamente; $P=0,024$). Diversos mecanismos de resistência ao calor, no nível de ovário, foram relatados por Souza-Cácares et al. (2019). Foram observadas maiores concentrações de proteínas HSP70, proteína de proteção ao estresse por calor, em oócitos de vacas adaptadas. A expressão destas proteínas

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

no CL pode explicar as diferenças observadas na área e fluxo sanguíneo do CL, porém, estudos futuros ainda são necessários para confirmar esta hipótese. Estudo anterior reportou que o estresse por calor pode agir diretamente no ovário e reduzir sua sensibilidade a gonadotrofinas (Wolfenson et al., 1997). Desta forma, as alterações no CL em resposta ao estresse térmico observadas neste estudo levam à inferência de que este pode ser um dos mecanismos pelos quais o estresse por calor impacta negativamente a eficiência reprodutiva, além dos conhecidos efeitos sobre a qualidade de oócitos.

Conclusões

O presente estudo demonstra que o estresse por calor altera respostas fisiológicas (TVg e FR) em bovinos mestiços da raça Girolando. Também, o estresse por calor tende a diminuir o grau de vascularização do CL, mas não afeta tamanho e fluxo sanguíneo em folículos pré-ovulatórios. Por fim, a área do CL foi maior em animais classificados geneticamente como termotolerantes quando mantidos em ambiente termoneutro, comparados às fêmeas termosensíveis. Estudos futuros serão realizados para avaliação de concentrações hormonais e qualidade de oócitos nestes animais.

Agradecimentos

Projeto financiado pela Embrapa (SEG 02.14.08.003.00.00.000). Agradeço a Embrapa Gado de Leite por ter me proporcionado tamanha experiência e aprendizado, ao meu orientador Luiz Gustavo Bruno Siqueira pela atenção e orientações, Carolina Capobianco Quintão pelo acompanhamento, cuidado, treinamento e a todos os membros e bolsistas do Laboratório de Reprodução Animal pela paciência e pelos múltiplos ensinamentos.

Referências

DIAS E SILVA, T. P.; DE SOUSA JÚNIOR, S. C. Produção de leite de vacas submetidas a diferentes períodos de exposição à radiação solar no sul do Piauí. **Agrarian**, v. 6, n. 21, p. 320-325, 2013. ISSN 1984-2538.

SIDDIQUI, M.A.R., ALMAMUN, M., GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Anim Reprod Sci**, 2009, v.113, p.287-92.

SILVA, T.A., MAIA, G.G., CAMARGO, L.S.A., SIQUEIRA, L.G.B. Associação entre o risco de estresse calórico, estação do ano e taxa de concepção em vacas leiteiras submetidas a Inseminação Artificial em Tempo Fixo. **XXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite**, 2018.

RHOADS, M.L.; RHOADS, R.P.; VANBAALE, M.J.; COLLIER, R.J.; SANDERS, S.R.; WEBER, W.J.; CROOKER, B.A.; BAUMGARD, L.H. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 5, p. 1986-1997, 2009.

DIKMEN, S.; KHAN, F. A.; HUSON, H. J.; SONSTEGARD, T. S.; MOSS, J. I.; DAHL, G. E.; HANSEN, P. J. The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 9, p. 5508-5520, 9/ 2014. ISSN 0022-0302. (método n° 967.03; AOAC, 2006)

SOUZA-CÁCARES, M.B.; FIALHO, A.L.; SILVA, W.A.; CARDOSO, J.T.; PÖHLAND, R.; MARTINS, M.I.; MELO-STERZA, F.A. Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. **Theriogenology**, 2019. *in press*

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 cow. **Anim Reprod Sci**, v. 47, n. 1-2, p. 9-19, 1997.