

Efeito do estresse térmico na resposta superovulatória e parâmetros bioquímicos em ovelhas Dorper superovuladas em ambiente tropical semiárido

Effect of heat stress on superovulatory response and biochemical parameters in superovulated Dorper sheep in a semi-arid tropical environment

Efecto del estrés térmico sobre la respuesta superovulatoria y los parámetros bioquímicos en ovelhas Dorper superovuladas en un ambiente tropical semiárido

Recebido: 11/03/2021 | Revisado: 18/03/2021 | Aceito: 22/03/2021 | Publicado: 30/03/2021

José Augusto de Sousa Bernardo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6345-5406>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: augusto_bernardo@hotmail.com

Edivânia Maria Freitas Bernardo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9381-3582>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: emf.vet@hotmail.com

Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5521-8571>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: robespierreaugusto@yahoo.com.br

Flávio Carneiro da Cunha Mergulhão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8080-4284>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: fmergulhao72@gmail.com

Joana Amélia de Senna Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4601-7855>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: joana.amelia29@gmail.com

Rafael Artur da Silva Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2806-1035>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: artur_rjs@hotmail.com

Gustavo Ferrer Carneiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9466-9500>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

Pierre de Castro Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5680-3940>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: pcastro.pe@hotmail.com

André Mariano Batista

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1904-0531>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: andre.batista@ufpe.br

Resumo

Este estudo avaliou a influência do estresse térmico na resposta superovulatória e no perfil bioquímico de ovelhas Dorper superovuladas em ambiente tropical semiárido. Foram utilizadas 13 ovelhas da raça Dorper, as quais foram submetidas à sincronização do estro e ao tratamento superovulatório, em dois períodos diferentes [termoneutro (TN) e estresse térmico (ET)]. As ovelhas foram inseminadas por laparoscopia utilizando sêmen congelado 42-43 horas após a remoção do dispositivo intravaginal. Cinco dias após a inseminação artificial, foi realizada laparotomia para avaliação da resposta ovariana e lavagem uterina. Coletou-se sangue para avaliação das variações nas concentrações séricas de glicose, frutossamina, triglicérides, β -hidroxibutirato (BHB), creatinina, ureia, proteína total, albumina, AST/TGO, GGT, Fosfatase Alcalina, Cálcio, Fosfato e Magnésio. Os períodos termoneutro (TN) e de estresse térmico (ET) tiveram temperaturas médias de 22,01 °C e 27,61 °C, respectivamente, com umidade relativa de 31,9%. Não houve diferença na resposta ovulatória e recuperação de estruturas entre os períodos TN e ET. As concentrações dos metabólitos séricos sofreram variação entre períodos térmicos e entre momentos de avaliação. Em conclusão, o período térmico não afeta

a eficiência do protocolo de superovulação em ovelhas Dorper criadas em ambiente tropical semiárido, mas provoca alterações nos metabólitos séricos.

Palavras-chave: Estresse térmico; Ovinos; Transferência de embrião.

Abstract

The aim of this study evaluated the influence of thermal stress on the superovulatory response and on the biochemical profile of superpervulated Dorper ewes in a semi-arid tropical environment. 13 Dorper sheep were used, which were submitted to estrus synchronization and superovulatory treatment, in two different periods [thermoneutral (TN) and thermal stress (ET)]. The sheep were inseminated by laparoscopy using frozen semen 42-43 hours after removal of the intravaginal device. Five days after artificial insemination, laparotomy was performed to assess the ovarian response and uterine lavage. Blood was collected to assess variations in serum concentrations of glucose, fructosamine, triglycerides, β -hydroxybutyrate (BHB), creatinine, urea, total protein, albumin, AST / TGO, GGT, Alkaline Phosphatase, Calcium, Phosphate and Magnesium. The thermoneutral (TN) and thermal stress (ET) periods had average temperatures of 22.01 ° C and 27.61 ° C, respectively, with a relative humidity of 31.9%. There is no difference in ovulatory response and recovery of structures between the TN and ET periods. Concentrations of serum metabolites varied between thermal periods and between assessment times. In conclusion, the thermal period does not affect the efficiency of the superovulation protocol in Dorper ewes reared in a semi-arid tropical environment, but causes changes in serum metabolites.

Keywords: Thermal stress; Sheep; Embryo transfer.

Resumen

Este estudio evaluó la influencia del estrés térmico en la respuesta superovulatoria y en el perfil bioquímico de ovejas Dorper superpervuladas en un ambiente tropical semiárido. Se utilizaron 13 ovejas Dorper, que fueron sometidas a sincronización de celo y tratamiento superovulatorio, en dos periodos diferentes [termoneutral (TN) y estrés térmico (ET)]. Las ovejas fueron inseminadas por laparoscopia usando semen congelado 42-43 horas después de la remoción del dispositivo intravaginal. Cinco días después de la inseminación artificial, se realizó laparotomía para evaluar la respuesta ovárica y el lavado uterino. Se extrajo sangre para evaluar variaciones en las concentraciones séricas de glucosa, fructosamina, triglicéridos, β -hidroxibutirato (BHB), creatinina, urea, proteína total, albúmina, AST / TGO, GGT, fosfatasa alcalina, calcio, fosfato y magnesio. Los períodos termoneutral (TN) y estrés térmico (ET) tuvieron temperaturas promedio de 22.01 ° C y 27.61 ° C, respectivamente, con una humedad relativa de 31.9%. No hay diferencia en la respuesta ovulatoria y la recuperación de estructuras entre los períodos TN y ET. Las concentraciones de metabolitos séricos variaron entre períodos térmicos y entre períodos de evaluación. En conclusión, el período térmico no afecta la eficacia del protocolo de superovulación en ovejas Dorper criadas en un ambiente tropical semiárido, pero provoca cambios en los metabolitos séricos.

Palabras clave: Estrés por calor; Ovino; Transferencia de embriones.

1. Introdução

No Brasil, a maior proporção (64,2%) da população de ovinos encontra-se em regiões áridas e semiáridas da região nordeste, onde ovinos desempenham importante papel socioeconômico (IBGE, 2017). Na maioria das regiões áridas e semiáridas do mundo, as condições climáticas registradas nos meses de verão produzem estresse térmico para os ovinos, uma vez que as altas temperaturas ambientais em combinação com baixa pluviosidade são cenários típicos da época (Macías-Cruz et al., 2016).

Tem sido observado que o estresse térmico causa uma série de mudanças nas funções biológicas de ovinos, tais como diminuição na ingestão e utilização dos alimentos, distúrbios no metabolismo da água, proteína, balanço energético e mineral, reações enzimáticas, secreções hormonais e metabólitos sanguíneos (Marai et al., 2001). Além disso, é conhecido que os processos reprodutivos das ovelhas (comportamento estral, ovulação, funcionalidade do corpo lúteo – CL, qualidade e implantação do embrião), são adversamente afetados pelo estresse térmico (Marai et al., 2008; Sejian et al., 2012).

Múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE), é uma ferramenta importante para a implementação do melhoramento genético e programas de conservação de rebanhos (Daly et al., 2020). Além disso, a MOTE pode acelerar os testes de progênie e permite a troca de germoplasma entre regiões geográficas isoladas com mínimo risco de transmissão de doenças (Thibier & Guérin, 2000). Entretanto, a utilização da superovulação e coleta de embriões é prejudicada pela grande variação observada na resposta ovariana, taxas de fertilização e qualidade dos embriões de ovelhas estimuladas hormonalmente (Cognié et al., 2003; Bergstein-Galan et al., 2019).

A variabilidade na resposta ovariana tem sido atribuída a diferenças nas preparações de gonadotrofinas, partida e dose, duração do tratamento e no uso de hormônios adicionais no esquema de superovulação – SOV (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Luna-Palomera et al., 2019). O sucesso da SOV também é dependente de fatores inerentes à individualidade do animal, à raça que está sendo utilizada, à época do ano e ao status nutricional (Gibbons e Cueto, 2011; Daly et al., 2020; Ledda et al., 2018). Em adição, tem sido reportado que o estresse térmico também influencia a resposta à superovulação em ovinos (Naqvi et al., 2004).

Entretanto, as informações disponíveis sobre o efeito do estresse térmico nos índices bioquímicos sérico e resposta superovulatória em ovinos no semiárido do Brasil, são escassas e esporádicas (Loiola Filho et al., 2015). Neste contexto, o presente estudo foi conduzido para avaliar a influência do estresse térmico, de altas temperaturas ambientais, na resposta superovulatória e no perfil bioquímico de ovelhas Dorper mantidas em ambiente tropical semiárido.

2. Metodologia

Utilizou-se o método hipotético para a realização desta pesquisa experimental, sendo assim, as variáveis quantitativas e qualitativas proporcionaram o melhor entendimento da causa e efeito, com o objetivo de testar a hipótese de que há interferência do calor sobre padrões reprodutivos e bioquímicos de ovelhas Dorper, método validado por Pereira et al. (2018). Todos os procedimentos de manejo e cuidado de animais foram realizados conforme recomendado pela lei brasileira sobre procedimentos para o uso científico de animais (Lei nº 11.794/2008).

2.1 Local do estudo

Este estudo foi conduzido na Fazenda Baraúnas, localizada no município de Sertânia, sertão do estado de Pernambuco a 08° 04' 14" de latitude Sul, 37° 15' 57" de longitude Oeste e altitude de 558 metros acima do nível do mar. Ao longo do ano, em geral a temperatura varia de 17 °C a 35 °C, e a presença de chuvas é escassa (média anual de 566 mm), caracterizando-se por clima semiárido quente.

2.2 Animais e manejo

Foram selecionadas 13 ovelhas da raça Dorper, adultas, clinicamente saudáveis, múltíparas, não-lactantes, com idade entre 2 e 4 anos, peso médio de 80 Kg e score de condição corporal (ECC) médio de 3,5 (escala, 1-5). Nenhum animal havia sido previamente utilizado para superovulação ou como receptora de embrião em programa de MOTE, nem foram submetidas a qualquer cirurgia abdominal. Durante todo o período do experimento, as ovelhas foram mantidas em apriscos de chão batido (4 x 5 m), equipados com comedouros e bebedouros, bem como área coberta com telhas de cerâmica (2 m²). As ovelhas foram alimentadas com volumoso a base de silagem de milho, suplementadas com 1,0 kg de ração comercial por animal/dia, ofertados 2 vezes por dia, além de água e sal mineral *ad libitum*.

As fêmeas foram divididas em dois grupos: Grupo Termoneutro (TN = 7 animais) e Grupo Estresse Térmico (ET = 6 animais), e submetidas ao protocolo de superovulação em dois períodos experimentais caracterizados pelas condições climáticas registradas durante os meses de agosto de 2016 e abril de 2017. Os dados sobre temperatura ambiente e umidade relativa desses dias experimentais foram coletados no Centro Meteorológico, Estação Experimental de Sertânia, Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC).

A maneira de estimar a severidade do estresse térmico foi proposta usando ambos temperatura ambiente e umidade relativa, denominado índice de temperatura e umidade (ITU) (Marai et al., 2007). Quando a temperatura é expressa em graus Celsius (°C), a equação para determinar o ITU é como segue: $ITU = bs \text{ } ^\circ\text{C} - \{(0.31 - 0.31 UR) (bs \text{ } ^\circ\text{C} - 14.4)\}$ onde $bs \text{ } ^\circ\text{C}$ é a temperatura de bulbo seco (°C) e UR é a umidade relativa (UR%)/100. Os valores obtidos indicam os seguintes níveis de estresse

por calor: <22,2 = ausência de estresse por calor (período termoneutro; TN); 22,2 a <23,3 = estresse moderado por calor; 23,3 a <25,6 = estresse severo por calor; e $\geq 25,6$ = estresse extremo por calor (período estresse térmico; ET) (Marai et al., 2001).

2.3 Sincronização do estro e superovulação das doadoras

Todas as ovelhas tiveram o estro sincronizado por meio da inserção de dispositivo intravaginal contendo 0,33 g de progesterona (CIDR[®], Zoetis, Brasil), os quais permaneceram por um período de 14 dias (dia da inserção designado como Dia 0). Aos 7 dias após a inserção do CIDR, todas as ovelhas tiveram os dispositivos substituídos e receberam injeção intramuscular (i.m.) de cloprostenol sódico (0,3 mL Ciosin[®], MSD Saúde Animal, Brasil). O tratamento superovulatório foi iniciado 48 horas antes da remoção do CIDR (D12), utilizando-se dose total de 256 mg de FSH-p, i.m. (Folltropin-V[®], Bioniche Animal Health, Canadá), divididas em oito aplicações em doses decrescentes com intervalo de doze horas. As ovelhas também receberam injeção i.m. de 200 UI de eCG (Novormon, Zoetis, Brasil), junto com a sexta aplicação de FSH-p. Os dispositivos foram removidos no momento da sexta aplicação de FSH-p. Para evitar potenciais variações na bioatividade do fármaco entre as partidas, frascos e lotes, as gonadotrofinas (Folltropin-V ou Novormon) foram agrupadas para preparar quantidades suficientes de ambas as drogas para tratar as 13 ovelhas.

2.4 Inseminação artificial

Todas as ovelhas foram mantidas em jejum por 24 horas antes da inseminação. A leve sedação foi realizada com associação de acepromazina (0,1mg/kg Acepran[®], Vetnil, Louveira, Brasil) e xilazina (Rompun, 4 mg i.m., Bayer S.A. Saúde Animal, São Paulo, Brasil) administrados 30 a 45 minutos antes da inseminação.

As inseminações foram realizadas utilizando técnica intrauterina laparoscópica 42-43 horas após a remoção do CIDR (D16). As ovelhas receberam dose comercial contendo 50×10^6 sptz/mL. O volume total de sêmen descongelado depositado em ambos os cornos uterino foi de 0,2 mL.

2.5 Avaliação das ovulações e lavagem uterina

Cinco dias após a inseminação artificial (D21), as ovelhas foram submetidas à laparoscopia para exame dos ovários. O número de corpos lúteos (CL's) e folículos não ovulatórios (FNov), foram registrados e a resposta ovariana foi estimada pelo somatório do número de CL e FNov. Ovelhas com menos que três CL's foram consideradas não responsivas ao protocolo de superovulação. A lavagem uterina foi realizada, sob anestesia geral, por meio da técnica de laparotomia pré-púbica. O útero foi exposto, mediante uma incisão de aproximadamente 8 cm, e cada corno uterino foi lavado pela inserção de uma agulha, ligada a uma seringa estéril com meio de lavagem (PBS contendo 2% de BSA; Sigma) perto da junção útero-tubária. Um cateter de Foley foi inserido na base dos cornos uterinos para recuperação das estruturas. Cada corno uterino foi lavado com 40 ml de PBS, coletado em placas de Petri e examinados para a presença de oócitos e embriões sob estereomicroscópio SMZ 540 (Nikon, Japão) com aumento de 40x.

2.6 Coleta de sangue e mensurações

Amostras de sangue da veia jugular, foram individualmente coletadas nos dias D0 (início do protocolo); D7 (troca dos dispositivos); D12 (início da superovulação); D16 (dia da IA) e D21 (dia da lavagem uterina), em tubos a vácuo estéril. Um tubo contendo fluoreto de sódio e K₃EDTA (Vacutainer, Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), como anticoagulantes para análise de glicose, enquanto o outro tubo não incluía anticoagulante para análises bioquímica e mineral. As amostras foram centrifugadas a $3.500 \times g$ por 15 min, e o plasma e soro foram removidos, depositados em microtubos identificados e armazenados à - 20 °C até as análises.

Os biomarcadores avaliados foram: glicose, frutossamina, triglicérides, β -hidroxibutirato (BHB), creatinina, ureia, proteína total, albumina, AST/TGO, GGT, Fosfatase Alcalina (FA), Cálcio, Fosfato e Magnésio. As determinações bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático BIOPLUS 2000, utilizando-se kit comercial Labtest[®]. A frutossamina foi determinada utilizando-se kit comercial Roche[®] (Fructosamine Plus), medida a 456 nm pela técnica do nitroblue tetrazolium. A concentração sérica de frutossamina foi corrigida tanto pela proteína sérica total quanto pela albumina sérica, utilizando-se, para tal, a fórmula descrita por Coppo et al. (1996).

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS 2009). Foi utilizado à análise de variância (Teste F), e as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa do teste de Student-Newman-Keuls, nos casos de significância do teste F. Análise de regressão das variáveis em função dos momentos de observação foi realizada. O nível de significância (p) adotado foi de 5%.

3. Resultados e Discussão

Entre todos os fatores climáticos, a temperatura do ar é a condição mais relevante sobre as alterações metabólicas e fisiológicas que compõem o estresse térmico (Dias & Silva et al., 2016; Joy et al., 2020). No presente estudo, durante os períodos experimentais, as temperaturas médias foram de 22,01 °C e 27,61 °C, para os períodos Termoneuro e de Estresse Térmico, respectivamente, sendo a umidade relativa média foi de 31,90% nos dois períodos. Portanto, o valor do ITU foram de 20,33 (TN) e 24,71 (ET), indicando que o grupo ET foi submetido a condições de estresse térmico severo por pelo menos oito horas, todos os dias.

A porcentagem de ovelhas que registraram resposta superovulatória (≥ 4 CL) foi semelhante independente de quando a estimulação foi realizada (85,7 e 83,3% durante o período termoneuro e o período estresse térmico, respectivamente). Uma das ovelhas tratadas, em cada período do estudo, não apresentou resposta ovulatória (sem CL) e, portanto, não foi submetida à lavagem uterina.

Ao analisar os dados apenas das ovelhas responsivas (≥ 4 CLs), não houve diferenças ($P > 0,05$) quanto ao número de corpos lúteos (CL), número de folículos não ovulatórios (FNov) e número de estruturas recuperadas (ER), entre tratamentos superovulatórios realizados no período TN ou no ET (Tabela 1). Estes resultados são similares àqueles observados por Loiola Filho et al. (2015), os quais avaliaram o efeito de doses reduzidas de FSH-p na produção de embriões em ovelhas Dorper. Curiosamente, não foram recuperadas estruturas fertilizadas em nenhum dos períodos do estudo. Estes resultados necessitam de maiores investigações.

Sabe-se que os ovinos, assim como todos os ruminantes, submetidos a um período de estresse térmico sofrem variações no metabolismo (Marai et al., 2007), como foi evidenciado pelas diferenças significativas do perfil metabólico dos animais entre os períodos estudados. As fontes de variação e o nível de P das variáveis referentes ao perfil energético, proteico e mineral podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 1. Média (\pm erro padrão) da resposta ovariana, (corpos lúteos, CL) + folículos não ovulatórios, FNov), estruturas recuperadas (ER) e taxa de recuperação de embriões, em ovelhas Dorper superovuladas nos períodos termoneuro (TN) ou de estresse térmico (ET).

	Período térmico	
	TN	ET
No. Total ovelhas	7	6
Resposta ov. (CL+FNov)	95 \pm 1,96	49 \pm 1,40
No. Ovelhas lavadas	6	5
Total CL ovelhas lavadas	82	44
Média CL	13,67 \pm 2,42	8,80 \pm 1,86
Total FNov ovelhas lavadas	13	5
Média FNov	2,17 \pm 0,91	1,00 \pm 0,40
Total N° ER	53	36
Média N° ER	8,83 \pm 2,28	7,20 \pm 2,80
Tx. Rec. estruturas	64,63 \pm 16,72	81,81 \pm 18,71

Fonte: Autores.

Como pode-se observar na Tabela 3, as concentrações séricas de uréia, FA e ácido úrico, foram maiores ($P < 0,05$) no grupo de ovelhas superovuladas no período de estresse térmico, enquanto os níveis de creatinina foram maiores ($P < 0,05$) no grupo de ovelhas superovuladas no período TN. Além disso, foi observado que os níveis de uréia variaram ao longo do protocolo de MOTE, sendo o maior valor (42,05 mg/dL; $P < 0,05$) obtido no D0 (Tabela 3). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os momentos, sobre os teores de creatinina, FA ou ácido úrico.

No presente estudo, os valores de uréia foram maiores nas temperaturas mais altas, confirmando os resultados obtidos em estudos anteriores, que podem ser atribuídos ao aumento da utilização de aminoácidos como fonte de energia. Isso pode resultar em perda de líquido extracelular devido à exposição ao calor, embora o teor de proteínas da dieta possa alterar a concentração sérica de uréia.

Tabela 2. Nível de significância (P valor) dos fatores de variação (grupos, momentos e interações) da análise de variância dos metabólitos referentes ao perfil energético, proteico e mineral do soro sanguíneo de ovelhas Dorper superovuladas nos períodos termoneuro (TN) ou estresse térmico (ET).

Metabólitos	P valor		
	Período	Momentos	Período \times Momentos
Proteína Total (g/dL)	0,3191	0,4264	0,0008
Albumina (g/dL)	0,0445	0,4905	0,0033
Uréia (mmol/L)	< 0,0001	< 0,0001	0,0966
Creatinina (mg/dL)	< 0,0001	0,0556	0,2058
Fosfatase Alcalina (U/L)	0,0110	0,9943	0,1409
GGT (U/L)	0,7923	0,1190	0,1440
Ácido Úrico (mmol/L)	0,0065	0,1530	0,5708
Glicose (mmol/L)	0,4170	0,1186	0,0063
Frutose (μ mol/L)	0,0008	0,5648	0,0230
Triglicerídeo (mmol/L)	0,3538	0,0202	0,1816
BHB (mmol/L)	0,0480	0,4543	0,0102
Cálcio (mmol/L)	< 0,0001	0,0171	< 0,0001
Fosfato (mmol/L)	0,3065	0,4910	0,0159
Magnésio (mg/dL)	0,0609	0,1271	0,1690

Fonte: Autores.

Na avaliação dos triglicérides não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos de ovelhas superovuladas nos diferentes períodos do estudo, estando os valores médios obtidos situados no intervalo de referência para a espécie ovina (Kaneko et al., 2008). Por outro lado, os níveis de triglicérides reduziram a partir do D7 ($P < 0,05$; Tabela 3). As concentrações de GGT e magnésio, não apresentaram diferença entre os grupos nem entre os diferentes momentos de acompanhamento das ovelhas

($P>0,05$).

Tabela 3. Valores médios e erro padrão (média±e.p.) das variáveis do perfil metabólico no soro sanguíneo de ovelhas Dorper superovuladas nos períodos termoneuro (TN) ou estresse térmico (ET).

Metabólitos	Período	Momentos de determinação do perfil metabólico					MG
		D0	D7	D12	D16	D22	
Uréia (mmol/L)	TN	28,63±3,40	10,41±3,40	25,80±3,40	20,74±3,40	26,30±3,40	22,4 ^B
	ET	55,47±3,67	29,57±3,67	35,27±3,67	35,62±3,67	35,93±3,67	38,4 ^A
	MG	42,05 a	19,99 c	30,54 b	28,18 b	31,12 b	
Creatinina (mg/dL)	TN	1,53±0,14	1,47±0,14	1,61±0,14	1,46±0,14	1,41±0,14	1,5 ^A
	ET	0,22±0,16	0,18±0,16	0,20±0,16	0,18±0,16	0,20±0,16	0,2 ^B
	MG	0,88	0,83	0,91	0,82	0,81	
Fosfatase Alcalina (U/L)	TN	89,04±23,32	83,76±23,32	75,79±23,32	79,73±23,32	60,54±23,32	77,8 ^B
	ET	165,80±25,18	164,87±25,18	176,42±25,18	169,20±25,18	188,33±25,18	173 ^A
	MG	127,42	124,32	126,11	124,47	124,44	
GGT (U/L)	TN	51,70±4,59	47,96±4,59	55,11±4,59	59,67±4,59	49,89±4,59	52,9
	ET	55,00±4,96	52,74±4,96	53,82±4,96	54,47±4,96	55,82±4,96	54,4
	MG	53,35	50,35	54,47	57,07	52,86	
Ácido Úrico (mmol/L)	TN	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,03±0,01	0,01 ^B
	ET	0,05±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,04 ^A
	MG	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	
Triglicérideo (mmol/L)	TN	21,71±2,80	21,04±2,80	15,20±2,80	18,10±2,80	20,16±2,80	19,2
	ET	23,10±3,02	15,28±3,02	13,18±3,02	17,68±3,02	13,23±3,02	16,5
	MG	22,41 a	18,16 b	14,19 b	17,89 b	16,70 b	
Magnésio (mg/dL)	TN	2,69±0,08	2,50±0,08	2,54±0,08	2,53±0,08	2,34±0,08	2,5
	ET	2,77±0,09	2,78±0,09	2,57±0,09	2,58±0,09	2,65±0,09	2,7
	MG	2,73	2,54	1,56	2,56	2,50	

A,B: diferença entre períodos; a,b: diferença entre tempos; MG: média geral. Fonte: Autores.

Na avaliação da concentração sérica da proteína total foram observadas diferenças significativas entre os momentos de observação ($P>0,05$) em ambos os períodos do estudo, e entre os períodos apenas no dia 16 das análises ($P>0,05$; Tabela 4), estando os valores médios situados dentro da faixa de normalidade para espécie, conforme relatado por Kaneko et al. (2008).

Tabela 4. Valores médios e erro padrão (média±e.p.) das variáveis do perfil metabólico no soro sanguíneo de ovelhas Dorper superovuladas nos períodos termoneutro (TN) ou estresse térmico (ET).

Metabólitos	Período	Momentos de determinação do perfil metabólico				
		D0	D7	D12	D16	D22
Proteína Total (g/dL)	TN	7,29±0,16AB	7,16±0,16B	7,13±0,16B	7,74±0,16Aa	7,21±0,16B
	ET	7,38±0,18A	7,03±0,18AB	7,15±0,18AB	6,80±0,18Bb	7,43±0,18A
Albumina (g/dL)	TN	2,79±0,12AB	2,70±0,12AB	2,73±0,12AB	2,87±0,12Aa	2,69±0,12B
	ET	2,50±0,12AB	2,40±0,12AB	2,50±0,12A	2,28±0,12Bb	2,58±0,12A
Glicose (mmol/L)	TN	45,06±4,65B	50,04±4,65B	64,61±4,65Aa	60,44±4,65A	41,16±4,65C
	ET	64,13±5,02A	58,93±5,02AB	48,63±5,02Bb	53,52±5,02B	49,72±5,02B
Frutosamina(μmol/L)	TN	227,83±7,86B	230,93±7,86Ba	240,60±7,86ABa	255,91±8,86Aa	231,77±7,86Ba
	ET	208,82±8,49	200,35±8,49b	197,88±8,49b	195,45±8,49b	205,25±8,49b
β-hidroxibutirato (mmol/L)	TN	0,14±0,02AB	0,14±0,02AB	0,10±0,02Bb	0,15±0,02A	0,14±0,02ABb
	ET	0,15±0,02B	0,18±0,02AB	0,20±0,02Aa	0,15±0,02B	0,20±0,02Aa
Cálcio (mmol/L)	TN	9,89±0,35a	9,94±0,35a	9,90±0,35a	10,53±0,35a	9,97±0,35a
	ET	8,16±0,38Ab	7,28±0,38Bb	7,90±0,38Ab	6,57±0,38Bb	8,33±0,38Ab
Fosfato (mmol/L)	TN	5,66±0,54	4,99±0,54	5,53±0,54	5,00±0,54	5,64±0,54
	ET	4,52±0,58B	6,35±0,58A	6,03±0,58A	6,55±0,58A	6,26±0,58A

A, B: na mesma linha, representam diferença entre dias; a,b: na mesma coluna, representam diferença entre períodos. Fonte: Autores.

Verificou-se também que os níveis de albumina foram influenciados pelo período térmico e pelo momento de análise do perfil bioquímico. No grupo TN, o nível de albumina foi maior no dia da inseminação (D16) que no dia da lavagem uterina (D22), enquanto que no grupo ET, os níveis dessa proteína foram inferiores no D16 em relação aos dias 12 e 22. Além disso, no D16 a concentração de albumina foi maior no grupo de ovelhas superovuladas no período TN em relação ao ET ($P<0,05$; Tabela 4). Os valores de albumina encontram-se situados dentro da normalidade considerada por Kaneko et al. (2008). Sendo a concentração de albumina um bom indicador de longos períodos de restrição proteica (Caldeira, 2007), os resultados obtidos ratificam a não ocorrência de déficit proteico nos animais em estudo.

Verificou-se diferença significativa nas concentrações de glicose entre os períodos apenas no dia 12, onde a maior média foi registrada no grupo de ovelhas superovuladas no período TN, bem como diferença significativa entre os momentos (Tabela 4) observando-se menor valor médio no D22 para o período TN e nos dias 16 e 22 para o período ET (Tabela 4).

Com relação às concentrações de frutosamina foram verificadas diferenças significativas entre os períodos de ET e TN ($P<0,05$), nos quais verificou-se diminuição nas concentrações médias de frutosamina nos dias 7, 12, 16 e 22 do tratamento, nas ovelhas superovuladas durante o período de ET (Tabela 4). Entretanto não foram verificadas diferenças estatísticas entre os momentos, durante o período de ET ($P>0,05$) havendo apenas diferenças no período TN entre os dias 12 e 16 do tratamento. A não ocorrência de variações nos valores médios da frutosamina ao longo dos momentos de observação no período de estresse térmico, associados aos valores de albumina obtidos neste estudo reforçam a inexistência de balanço energético negativo nos animais estudados neste período. Indicando possivelmente um fator positivo sobre os aspectos reprodutivos nestes animais, podendo explicar a não diferença significativa na resposta ovariana dos animais tratados nos diferentes períodos.

Foi observada diferença significativa na concentração sanguínea de β-hidroxibutirato entre os momentos, independente do período do estudo, além disso, verificou-se efeito do período com aumento significativo dos valores médios desta variável, nos dias 12 e 22 do protocolo, nas ovelhas superovuladas no período ET (Tabela 4).

Ao longo de todo o protocolo de MOTE, os níveis séricos de cálcio foram maiores no período TN em relação ao ET;

no entanto, dentro do período ET, menores níveis desse mineral foram observados nos dias D7 e D16 ($P < 0,05$; Tabela 4). Os valores de cálcio mantiveram-se dentro do limite de referência relatado por Contreras et al. (2000) em ovelhas no Chile, e inferiores aos reportados por Kaneko et al. (2008). Esta diminuição da concentração de cálcio no período de ET pode ser explicada pela diminuição da ingestão de alimentos, que ocorre em épocas de maior temperatura (Kadzere et al., 2002) logo, a redução na ingestão de alimento, causada pelo aumento da temperatura no período de ET, acarreta em consequências diretas na alimentação, consequentemente na metabolização e absorção de minerais (Indu et al., 2015). Corroborando dados encontrados por Srikandakumar et al. (2003) ao avaliarem a concentração de cálcio no plasma de ovinos sobre influência de estresse calórico. Na avaliação da concentração sérica de fosfato não foi verificada diferença entre os períodos ($P > 0,05$), no entanto, durante o período de ET, os níveis de fosfato aumentaram no D7 e se mantiveram estáveis nos períodos subsequentes.

Rodrigues et al. (2010) destacam que o estresse térmico provoca mudanças drásticas nas funções biológicas, incluindo diminuição de consumo de alimentos e consequentemente, perturbações no metabolismo da água, proteínas, energia e de metabólitos. Estes efeitos negativos se revertem em prejuízos na sanidade, produção e também reprodução nos animais (Marai et al., 2007; Kumar et al., 2011). Apesar de não haver mudanças no perfil reprodutivo nos animais entre os períodos de ET e TN, houve variações metabólicas, a manutenção da reposta ovariana nos animais durante o período de estresse térmico pode ser explicada pelo protocolo de MOTE utilizado.

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os protocolos de superovulação podem ser aplicados com sucesso em ovelhas Dorper, independentemente do período do ano. Por outro lado, nossos resultados mostraram variações nos parâmetros metabólicos relacionadas às mudanças na temperatura ambiente, umidade relativa e índice temperatura-umidade, embora dentro da faixa fisiológica para ovinos. Portanto, podemos afirmar que as variações sazonais podem influenciar o perfil metabólico da ovelha Dorper. Novos estudos serão necessários para investigar possíveis mecanismos relacionando o estresse térmico e a falha da fertilização.

Referências

- Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., & Kozicki, L. E. (2019). Effect of semen and donor factors on multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 401–407.
- Caldeira, R. M., Belo, A. T., Santos, C. C., Vazques, M. I., & Portugal, A. V. (2007). The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin. Research*, 68, 233-241.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryos technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171-188.
- Contreras, P. A., Wittwer, F., & Böhmwald, H. (2000). Uso dos perfis metabólicos no monitoramento nutricional dos ovinos, p.75-88. In: González, F. H. D., Barcelos, J. O., Ospina, H., & Ribeiro, L. A. O. (Eds), Perfil Metabólico em Ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Daly, J., Smith, H., McGrice, H. A., Kind, K. L., & van Wettere, W. H. E. J. (2020). Towards Improving the Outcomes of Assisted Reproductive Technologies of Cattle and Sheep, with Particular Focus on Recipient Management. *Animals*, 10(2): 293.
- Dias E Silva, T. P., Costa Torreão, J. N., Torreão Marques, C. A., de Araújo, M. J., Bezerra, L. R., Kumar Dhanasekaran, D., & Sejian, V. (2016). Effect of multiple stress factors (thermal, nutritional and pregnancy type) on adaptive capability of native ewes under semi-arid environment. *Journal of Thermal Biology*, 59, 39-46.
- Gibbons, A. E., & Cueto, M. (2011). *Embryo Transfer in Sheep and Goats. A training manual*. Bariloche Experimental Station National Institute for Agricultural Technology Argentina.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J., & Lopez-Sebastian, A. (2000). Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54, 1055-1064.
- Indu, S., Sejian, V., Kumar, D., Pareek, A., & Naqvi, S. M. K. (2015). Ideal proportion of roughage and concentrate for Malpura ewes to adapt and reproduce in a semi-arid tropical environment. *Tropical Animal Health Production*, 47(8), 1487-1495.

- Joy, A., Dunshea, F. R., Leury, B. J., Clarke, I. J., DiGiacomo, K., & Chauhan, S. S. (2020). Resilience of Small Ruminants to Climate Change and Increased Environmental Temperature: A Review. *Animals*. 10(5), 867.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press.
- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*. 77, 59-91.
- Kumar, B. V. S., Ajeet, K., & Meena, K. (2011). Effect of heat stress in tropical livestock and different strategies for its amelioration. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 7(1), 45-54.
- Ledda, S., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018) ET-Technologies in Small Ruminants. In: Niemann H., Wrenzycki C. *Animal Biotechnology*.
- Loiola Filho, J. B., Monte, A. P. O., Souza, T. T. S., Miranda, M. S., Magalhães, L. C., Barros, C. H. S. C., Silva, A. A. A., Santos, A. O., Guimarães, A. S. L., Costa, J. M. S., Cruz, R. B., Cordeiro, M. F., & Lopes Júnior, E. S. (2015). Efeito da redução da dose de pFSH na produção in vivo de embriões em ovelhas Dorper. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(2), 4215-4224.
- Luna-Palomera, C., Macías-Cruz, U., & Sánchez-Dávila, F. (2019). Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. *Tropical Animal Health Production*. 51, 1283–1288.
- Macias-Cruz, U., López-Baca, M. A., Vicente, R., Mejía, A., Álvarez, F. A., Correa-Calderón, A., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., Guerra-Liera, E. J., & Avendaño-Reyes, L. (2016). Effects of seasonal ambient heat stress (spring vs. summer) on physiological and metabolic variables in hair sheep located in an arid region. *International Journal of Biometeorology*. 60, 1279–1286.
- Marai, I. F. M., Ayyat, M. S., & Abd El-Monem, U.M. (2001) Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions, *Tropical Animal Health Production*. 33, 457–462.
- Marai, I. F. M., El-Darawny, A. A., Fadiel, A., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2007). Physiological traits as affected by heat stress in sheep. *Small Ruminant Research*. 71, 1-12.
- Marai, I. F. M., El-Darawany, A. A., Fadiel, A., Abdel-Hafez, M. A. M. (2008). Reproductive performance traits as affected by heat Stress and its alleviation in sheep: a review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 8, 209–234.
- Naqvi, S. M. K., Maurya, V. P., Gulyani, R., Joshi, A., & Mittal, J. P. (2004). The Effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Ruminant Research*. 55, 57-63.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2008). Metodologia da Pesquisa Científica. UFSM.
- Rodrigues, N. E. B., Zangeronimo, M. G., & Fialho, E. T. (2010) Adaptações fisiológicas de suínos sob estresse térmico. *Revista Eletrônica Nutritime*. 7(2): 1197-1211.
- Sejian, V., Maurya, V. P., & Naqvi, S. M. K. (2012). Effect of walking stress on growth, physiological adaptability and endocrine responses in Malpura ewes in a semi-arid tropical environment. *International Journal of Biometeorology*. 56, 243–252.
- Srikandakumar, A., Jonhson, E. H., & Mahgoub, O. (2003). Effect of heat stress on respiratory rate, rectal temperature and blood chemistry in Omani and Australian Merino sheep. *Small Ruminant Research*. 49, 193-198.
- Thibier, M., & Guérin, B. (2000). Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. *Livestock Production Science*. 62, 253-270.