

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Veterinária - Departamento de Clínicas Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)
Campus Universitário – 96010 900 - Pelotas/RS - www.ufpel.edu.br/nupeec
E-mail: nupeec@ufpel.edu.br - Tel: (53) 3275 7295

INFLUÊNCIA DO JEJUM E DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA SOBRE O NÚMERO DE FOLÍCULOS OVARIANOS EM OVELHAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DE CIOS

HAX, L.T.^{5,6*}; SCHNEIDER, A^{1,6}; PFEIFER, L. F. M.^{2,6}; SILVA NETO, J. W. da^{5,6}; ANTUNES, M. M.^{5,6} SARAY, L.R.⁶; DEL PINO, F. A. B.³; CORRÉA, M. N.^{4,5,6}

RESUMO

A condição alimentar influencia os parâmetros hormonais dos ruminantes, influenciando seu desempenho reprodutivo. Este trabalho objetivou avaliar a influência do jejum e da insulina no número de folículos ovarianos em ovelhas submetidas à sincronização de cios. Foram utilizadas 15 ovelhas, cujo ciclo estral foi sincronizado. Foi considerado o dia 0 (D0) o dia da inserção do dispositivo intravaginal (CIDR[®]). No D3 os animais foram divididos em 3 grupos: o grupo controle (GC) recebeu uma dieta de manutenção, o grupo insulina (GI) recebeu a mesma dieta do GC e injeções de insulina (Novolin[®]) a cada 12 horas do D3 ao D7 e o grupo jejum (GJ), que foi submetido ao jejum alimentar do D3 ao D7. Após 32 horas da remoção do CIDR[®] (D6) as ovelhas foram abatidas. Os ovários foram recolhidos e os folículos contados, medidos e classificados em pequeno (P), < 2 mm, médio (M), entre 2 e 4 mm e grande (G), maiores que 4 mm. A média de folículos P, M e G por animal no GC foi de 14,2, 0,8 e 1,2, no GI de 9,0, 0,4 e 1,0 e no GJ de 9,0, 1,2 e 1,2 respectivamente, não havendo diferença ($P>0,05$) entre os grupos. Observou-se ainda que o GI teve numericamente menos folículos que os outros dois grupos e folículos pré-ovulatórios maiores. Assim concluiu-se que o jejum ou a insulina exógena não influenciaram o número de folículos ovarianos possivelmente devido ao reduzido número de animais utilizados.

PALAVRA-CHAVE: folículo, insulina, jejum, ovelha.

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

²Faculdade de Agronomia, UFPel

⁴Departamento de Clínicas Veterinária

³Departamento de Bioquímica, UFPel ⁴Departamento de Clínicas Veterinária

⁵Faculdade de Veterinária, UFPel

⁶Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) - www.ufpel.edu.br/nupeec,

INTRODUÇÃO

O manejo nutricional está diretamente ligado com o desempenho reprodutivo de um rebanho. A expressão da genética dos rebanhos bovinos é influenciada pela condição nutricional a que os mesmos são submetidos. Sendo que a manutenção, diminuição ou incremento da condição corporal das fêmeas condiciona os níveis de hormônios metabólicos na circulação, que são responsáveis por funções endócrinas e reprodutivas (Scaramuzzi *et al*, 2006).

O número de folículos assim como a taxa de ovulação é diretamente influenciado pela nutrição através de mudanças nos marcadores metabólicos como insulina, glicose, leptina e hormônio do crescimento (GH) (Scaramuzzi *et al*, 2006). Essas mudanças, características do balanço energético negativo, promovem alterações na atividade de moduladores intraovarianos.

Com reduzidas concentrações plasmáticas de insulina há uma diminuição da expressão de receptores de GH no fígado. O GH no tecido hepático, tem a função de estimular a produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), cuja atividade mitogênica é essencial no crescimento e diferenciação celular bem como na produção de estradiol no folículo dominante (Shimizu *et al*, 2007).

Os níveis de insulina influenciam a atividade ovariana (Meza-Herrera *et al*. 2007), estimulando a liberação do GnRH e de FSH, bem como a pulsatilidade de LH e a secreção de progesterona (Arias *et al*, 1993). Sabe-se ainda que a insulina modula a resposta da granulosa às gonadotrofinas, estimulando a produção de estradiol (Shimizu *et al*, 2007).

O estradiol estimula a secreção de LH que irá aumentar a expressão de receptores de insulina nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, além de diminuir a liberação de FSH contribuindo com a atresia dos folículos subordinados (Shimizu *et al*, 2007). Essas observações concordam com os achados de Almeida *et al*. (2001), que reportaram um aumento no número de folículos e menor taxa de atresia folicular, com conseqüente aumento na taxa de ovulação, em fêmeas submetidas à restrição alimentar recebendo insulina exógena. Da mesma forma Simpson *et al*. (1994) observaram que a infusão de insulina em novilhas de corte aumentou o diâmetro do folículo dominante.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do jejum e da administração de insulina durante um período de 96 horas sobre o número de folículos ovarianos de ovelhas submetidas à sincronização de cios.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro Experimental de Ovinos da Universidade Federal de Pelotas - RS. Foram utilizadas 15 ovelhas com peso médio de $54,06 \pm 5,44$ e condição corporal de $3,08 \pm 0,26$ mantidas em sistema de confinamento recebendo uma dieta de manutenção, baseada em feno e concentrado.

As ovelhas foram submetidas a uma sincronização de cios através da inserção de pessários intravaginais impregnados com acetato de medroxiprogesterona (MAP) por 12 dias, sendo que todas exibiram estro dentro

de 72 horas após a retirada do pessário. No 11^o dia do ciclo estral seguinte todas receberam injeção de 125 µg de cloprostenol sódico (i.m., Ciosin[®], Fort Dodge) e 36 horas após, injeção de 100 µg de gonadorelina (i.m., Fertigen[®], Tortuga). Vinte e quatro horas após foi inserido um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (Eazi-Breed CIDR[®], InterAg), que permaneceu nas ovelhas por 6 dias, sendo que no momento da remoção do dispositivo foi aplicado 125 µg de cloprostenol sódico (i.m., Ciosin[®], Fort Dodge). Aproximadamente 32 horas após a remoção do dispositivo intravaginal as ovelhas foram sacrificadas em um abatedouro. O dia da inserção do dispositivo foi considerado o dia 0 (D0) e o abate ocorreu no D7.

No D3 os animais foram divididos em 3 grupos, sendo: grupo controle (GC), que recebeu uma dieta de manutenção, de acordo com o NRC (1985), grupo insulina (GI), que recebeu a mesma dieta do GC e também injeções subcutâneas a cada 12 horas de 0,25 UI.kg⁻¹ de insulina humana recombinante (Novolin[®] N, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) do D3 ao D7 e grupo jejum (GJ), que foi submetido ao jejum alimentar do D3 ao D7.

Após o abate, os ovários foram recolhidos. Os folículos foram contados e medidos, sendo classificados em: pequenos (P), os menores de 2 mm, médios (M), os maiores de 2 mm e menores de 4 mm, e grandes (G), os maiores de 4 mm (Meza-Herrera *et al.* 2007).

Os dados foram avaliados no programa SAS[®] (2002) através do método Non-parametric One-way ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais ovularam com a aplicação de gonadorelina no D-1 e apresentaram um corpo lúteo (CL) na avaliação ovariana. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos quanto ao número de folículos (Tabela 1). No entanto, o GJ obteve numericamente menos folículos que o GC. Esse achado pode ser reflexo da restrição alimentar sofrida pelo grupo, que provavelmente levou à diminuição das concentrações sanguíneas de glicose e insulina.

Tabela 1. Média e classificação dos folículos por animal de cada grupo.

Grupo	<2 mm	2 – 4 mm	>4 mm	Total
GC	14,2 ± 9,88	0,8 ± 0,84	1,2 ± 0,45	16,2 ± 10,35
GI	9,0 ± 9,92	0,4 ± 0,55	1,0 ± 0,00	10,4 ± 10,38
GJ	9,0 ± 5,79	1,2 ± 0,84	1,2 ± 0,45	11,4 ± 5,94

A glicose influencia no crescimento folicular uma vez que é a principal fonte de energia para o metabolismo ovariano (LEROY *et al.*, 2004), enquanto que a insulina atua na esteroidogênese, desenvolvimento folicular e maturação do ovócito. Durante o jejum, os animais possivelmente se encontravam com reduzidas concentrações de glicose, o que provocou uma redução das concentrações de insulina, levando à uma redução da esteroidogênese, o que provavelmente explica a diferença numérica na quantidade de folículos pequenos observada entre os grupos. Pois com menores concentrações de estradiol, há uma maior concentração de FSH, o que permite o recrutamento de maior número de folículos FSH dependentes.

A provável redução das concentrações de insulina pode ter diminuído a ação do GH no fígado, o que reduziria a concentração sanguínea de IGF-I, fundamental para o processo de ativação de folículos primordiais (Buratini *et al.*, 2000), justificando a redução numérica dos folículos pequenos observada no GJ.

O GI obteve numericamente menos folículos do que o GC e o GJ, possivelmente pela resposta heterogênea entre os seus indivíduos quanto ao número de folículos (Tabela 2). Acredita-se que esse fato tenha ocorrido devido a uma diferença individual do número de ondas foliculares de cada animal. No D3, quando os animais começaram a receber insulina, possivelmente as cinco ovelhas não estavam em um mesmo estágio da onda folicular.

Tabela 2: Número de folículos das ovelhas do GI.

Animal	< 2 mm	2 – 4 mm	> 4 mm	FO* (mm)	Total
1	11	1	1	7	13
2	2	0	1	10	3
3	0	0	1	10	1
4	7	0	1	10	8
5	25	1	1	6	27

*Folículo Ovulatório

A duas ovelhas que apresentaram um número maior de folículos de todos os tamanhos, provavelmente estavam na fase de recrutamento folicular, pois se sabe que a insulina aumenta o número de folículos recrutados (Almeida *et al.* 2001). Já as três ovelhas que obtiveram um menor número total de folículos, porém com um folículo pré-ovulatório maior, provavelmente estavam na fase de dominância, sendo a insulina utilizada pelo folículo dominante para aumentar a entrada de glicose no mesmo, o que possivelmente também aumentou sua produção de estradiol (Shimizu *et al.*, 2007). Dessa forma, o folículo dominante também aumentou sua produção de inibina, inibindo a secreção de FSH e provocando a atresia dos folículos FSH dependentes.

CONCLUSÃO

Não foi constatada a influência do jejum e da insulina no número de folículos, pois não houve diferença entre os grupos, possivelmente devido ao baixo número de animais utilizados. Novos estudos com um maior número de animais poderão melhor elucidar os efeitos da insulina e do jejum no número de folículos ovarianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.R.C.L.; MAO, J.; NOVACK, S.; COSGROVE, J.R.; FOXCROFT, G.R. 2001. Effects of different patterns of feed restriction and insulin treatment during the luteal phase on reproductive, metabolic and endocrine parameters in cyclic gilts. **Journal of Animal Science**. 79, 200 – 212.

ARIAS, P.; JARRY, H.; LEONHARDTIS, S.; MOGUILVSKY, J.; WUTTKE, W. 1993. Estradiol modulates the LH release response to N-methyl-D-aspartate in

adult female rats: studies on hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone and neurotransmitter release. **Neuroendocrinology** 57, 710 – 715.

BURATINI JR., LA CA. J.A.J. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. Visintin' and G.A. Bo3 **Theriogenology** 54, 421 – 431. 2000.

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

MEZA-HERRERA, C.A.; HALLFOR, D.M.; ORTIZ, J.A.; CUEVAS, R.A.; SANCHEZ, J.M.; SALINAS, H.; MELLADO, M.; GONZALEZ-BULNES, A. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. **Animal Reproduction Science**, June 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of sheep. 6.ed. Washington, D.C.: NAS, 1985. 99p.

SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; MUÑOZ-GUTIERREZ, M.; SOMCHIT, A., 2006. Supplementary nutrition in the ewe on the concentration of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction, Nutrition and Development**. 46 339 – 354.

SIMPSON, R.B.; CHASE Jr., C.C.; SPICER, L.J.; VERNAN, R.K.; HAMMOND, A.L.; RAE, D.O., 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin like growth factor 1, insulin like growth factor binding activity, follicular estradiol and progesterone and follicular growth in superovulated angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**. 102, 483 – 492.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS: Statistical Analysis System - Getting Started with the SAS® Learning Edition. Cary, NC: **SAS Institute**. 2002.

TAKASHI SHIMIZU; CHIAKI MURAYAMA; NATSUKO SUDO; CHINO KANASHIMA; MASA TETSUKA; AKIO MIYAMOTO. Involvement of insulin and growth hormone (gh) during follicular development in the bovine ovary. **Animal Reproduction Science**, 11 april 2007.