



EFEITO DA INSULINA EXÓGENA E DO JEJUM SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E FOLICULARES DE OVELHAS

¹ANTUNES, Marcelo Moreira; ²SCHNEIDER, Augusto; ³HAX, Lucas Teixeira; ⁴NETO, José Wilson da Silva; ⁵CORRÊA, Marcio Nunes.

¹Graduando em Medicina Veterinária – Fac. Veterinária – UFPel

²Médico Veterinário, MsC., Doutorando Biotecnologia Agrícola – UFPel

³Graduando em Medicina Veterinária – Fac. Veterinária – UFPel

⁴Médico Veterinário

⁵Médico Veterinário, MsC., Dr., Prof. Adjunto Fac. Veterinária – UFPel

E-mail: nupeec@gmail.com - 0XX (53) 3275 7188

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos da nutrição sobre a reprodução são bem conhecidos e amplamente relatados. Inúmeros estudos têm testado a hipótese de que sinais nutricionais (por exemplo, hormônios metabólicos) exercem efeito direto a nível ovariano (Rhind S. M., 1992). Assim, mudanças no perfil metabólico, como aquelas associadas à restrição alimentar, afetam, negativamente, o desenvolvimento folicular (Butler *et al.*, 2004). Em ovelhas, as populações de folículos são muito sensíveis às mudanças nutricionais, onde a foliculogênese e a ovulação podem ser rapidamente aumentadas pela manipulação nutricional (Martin *et al.*, 2004).

A insulina é um importante hormônio metabólico que atua no transporte de glicose e aminoácidos para o interior da célula, favorecendo a síntese de proteínas, glicogênio e triglicerídeos (González & Silva, 2006). Estudos *in vivo* demonstraram que a insulina estimula, diretamente, tanto a mitose quanto a produção de esteróides em células da granulosa (Gutierrez *et al.*, 1997), teca (Stewart *et al.*, 1995) e luteais (Mmluk *et al.*, 1999). *In vitro*, a insulina vai atuar com o folículo hormônio estimulante (FSH) para estimular a secreção de estradiol pelas células da granulosa (Davoren & Hsueb, 1984).

Um período curto de melhora na nutrição estimula a ovulação em ovelhas, onde uma consequência normal do aumento do suprimento energético é o aumento na circulação de insulina. Mudanças em curto-prazo no plano nutricional têm demonstrado influenciar o recrutamento de pequenos folículos antrais (1 à 4mm) (Gong *et al.*, 2002). No entanto, Injeções de insulina em ovelhas durante a fase luteal aumentaram o número de grandes folículos (Hinch & Roelofs, 1986).

Segundo FOSTER *et al.* (1989), a síntese e secreção das gonadotropinas são reduzidas em condições de subnutrição. Um curto período de restrição alimentar diminuiu a secreção de estradiol e hormônio luteinizante (LH) em hamsters da Síria (Morin, 1986). Entretanto, efeitos similares não foram consistentemente demonstrados em ruminantes maduros, já que ovelhas e bovinos adultos parecem resistir à restrição alimentar, em parte devido às reservas nutricionais do rúmen

(Tatman *et al.*, 1991). RHIND & MCNEILLY (1998) não encontraram diferenças no número de grandes folículos (> 2,5mm), apesar de terem encontrado maior quantidade de folículos pequenos (1-2,5mm) em ovelhas com alta ingestão (*ad libitum*) do que em ovelhas com baixa ingestão alimentar.

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da injeção de insulina e do jejum sobre parâmetros metabólicos e foliculares de ovelhas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze ovelhas múltiparas (Corriedale x Texel), não lactantes e com 2,5 anos de idade foram utilizadas durante a estação de parição na cidade de Pelotas/RS. Os animais foram alojados em baias cobertas (2,00 x 3,50m) em três grupos de 5 ovelhas cada. A média de peso de cada grupo foi 53,40±6,10, 56,40±3,91 e 52,80±5,21 kg e a média do escore de condição corporal foi 3,10±0,22 (1=magra e 5=obesa). A dieta foi baseada em feno de alfafa, concentrado e acesso a vontade à água.

As ovelhas foram submetidas a um protocolo de pré-sincronização com esponjas intravaginais contendo 60mg acetato de medroxiprogesterona e observadas quanto ao cio. No 11º dia do ciclo estral todas as ovelhas receberam uma injeção de 125µg de cloprostenol sódico (i.m., Ciosin®). Trinta e seis horas após, 100µg de gonadorelina (i.m., Fertigen®) foi administrado para induzir a ovulação em torno de 24 horas depois. Vinte e quatro horas após a injeção de gonadorelina, um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR®) foi inserido e permaneceu nas ovelhas por 6 dias, quando 125µg de cloprostenol sódico (i.m., Ciosin®) foi injetado. O momento da retirada do CIDR® foi considerado o dia 0 do experimento.

No dia -2 as ovelhas foram separadas por peso e escore de condição corporal para os grupos experimentais: 1) grupo controle (n=5), receberam uma dieta de manutenção durante todo o período experimental; 2) grupo jejum (n=5), em que o alimento foi completamente retirado desde o dia -2 ao dia 2, somente com acesso à água; e 3) grupo insulina (n=5) que receberam a mesma dieta do grupo controle, aliado a injeções de insulina recombinante humana (s.c., 0,25 IU/kg, Novolin®) duas vezes ao dia desde o dia -2 até o dia 2.

Amostras sanguíneas foram coletadas diariamente do dia -2 ao dia 2 antes da alimentação pela manhã (12 horas de jejum). O plasma foi separado e armazenado em micro tubos a -80°C até serem analisados para glucose, ácidos graxos não esterificados (NEFA), insulina e estradiol.

No dia 2, aproximadamente 32 horas após a retirada do CIDR®, todas as ovelhas foram sacrificadas e os ovários coletados. Apenas o maior folículo do par de ovários foi dissecado (1 folículo/ovelha) e o seu diâmetro considerado para análises posteriores. Todos os folículos do par de ovários foram contados e classificados de acordo com o diâmetro em: pequenos (< 2 mm), médios (2 – 4 mm) e pré-ovulatórios (> 4 mm) (Sarath *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nós consideramos que todas as ovelhas ovularam com a injeção de gonadorelina no dia -7, já que as mesmas apresentaram um corpo lúteo no dia 2.

As injeções de insulina aumentaram ($P < 0,05$) as concentrações plasmáticas de insulina no dia -1 nas ovelhas em jejum. A concentração plasmática de glucose aumentou ($P < 0,02$) nos dias 1 e 2 no grupo insulina. O jejum aumentou ($P < 0,0001$) as concentrações plasmáticas de NEFA do dia -1 ao 2.

O grupo insulina teve as maiores concentrações de estradiol no dia 2 ($53,70 \pm 1,82 \text{ pg/mL}$, $P < 0,05$) comparado aos grupos jejum e insulina, assim como citou Butler *et al.*, 2004.

O diâmetro do folículo pré ovulatório no dia 2 não foi diferente entre os grupos, $7,40 \pm 0,37$, $7,10 \pm 0,55$ e $8,60 \pm 0,87 \text{ mm}$ para os grupos jejum, controle e insulina, respectivamente, apesar de que folículos do grupo insulina apresentaram, numericamente, os maiores diâmetros. Conforme BAIRD & SCARAMUZZI (1976), a maioria do estradiol secretado do ovário é derivado dos grandes folículos estrogênicos. O diâmetro do corpo lúteo, induzido no dia 7, também não foi diferente entre os grupos ($4,78 \pm 0,47 \text{ mm}$).

No dia 2 houve uma correlação positiva entre glucose e estradiol ($n=5$, $r=0,97$, $P < 0,01$) somente no grupo jejum. Houve uma correlação positiva entre estradiol e o diâmetro folicular, no grupo insulina no dia 2. A insulina age através de seu próprio receptor para modular a resposta das células da granulosa as gonadotropinas e aumentar a produção de estradiol pelas mesmas. (Willis *et al.*, 1996)

4. CONCLUSÕES

A aplicação de insulina aumentou a produção de estradiol, porém não obteve efeito sobre o folículo pré-ovulatório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Butler, S.T., Pelton, S.H., Butler, W.R., 2004. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**. 127, p.537-545.

Davoren, J. B. & Hsueh, A. J. W. 1984. Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 35: p.97–105.

FOSTER, D. L., EBLING, E. J. P., MICKS, A. F., *et al.* 1989. Metabolic interface between growth and reproduction: nutritional modulation of gonadotropin, prolactin and growth hormone secretion the growth limited female lamb. **Endocrinology**. 125: p.342-350.

Gong, J. G., Lee, W.J., Garnsworthy, P. C. & Webb, R. 2002. The effect of dietary induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**. 123: 419–427.

González, F. H. D. & Silva, S. C. 2006. Bioquímica clínica de glicídeos. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.153-210.

Gutierrez, C. G., Campbell, B. K. & Webb, R. 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol

production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**. 56: p.608–616.

Hinch, G. N. & Roelofs, J. H. W. 1986. Lupin feeding and insulin infusion during the late luteal phase can increase ovulation rate in sheep. **Proceedings of the Australian Society for Reproductive Biology**. 18: p.43. (Abstract).

Martin, G. B., Milton, J. T. B., Davidson, R. H., Banchemo Hunzicker, G. E., Lindsay, D. R., Blache, D. 2004 Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Anim Reprod Sci**. 82–83: p.231–245.

Mamluk, R., Greber, Y & Meidan, R. 1999. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**. 60: p.628–634.

Morin, L. P. 1986. Environment and hamster reproduction: responses to phase-specific starvation during estrous cycle. **Am. J. Physiol**. 251: p.663–669.

RHIND, S. M., 1992. Nutrition: Its effects on reproductive performance and its hormonal control in female sheep and goats. **Progress in sheep and goat research, Speed, A.W. (ed.) C.A.B. International**. p.25-51.

Rhind, S. M. & McNeilly, A. S. 1998. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. **Anim Reprod Sci**. 52: p.131–138.

Sarath, T., Mehrotra, S., Agarwal, S. K., Varshney, V. P., Hoque, M., Shankar, U., Singh, S. K., 2008. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. **Anim Reprod.Sci**. 108: p.216-225.

Stewart, R. E., Spicer, L. J., Hamilton, T. D., Keefer, B. E. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**. 73: p.3719–3731.

Tatman, W. R., Judkins, M. B., Krysl, L. J. & Moss, G. E. 1991. Gastrointestinal digesta passage and fermentation patterns associated with restricted intake of a low quality forage in ewes. **Small Ruminant Research**. 4: p.393-399.

Willis, D., Mason, H., Gilling-Smith, C., Franks, S., 1996. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. **J Clin Endocrinol Metab**. 81: 302-309.