

Perfil de FSH e LH na divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*)

Lindsay Unno GIMENES¹
Manoel Francisco SÁ FILHO¹
José Ribamar TORRES-JÚNIOR¹
Maria Paula BELTRAN²
Guilherme de Paula
NOGUEIRA²
Pietro Sampaio BARUSELLI¹

Correspondência para:

e-mail: lindsay_unno@yahoo.com (L.U. Gímenes) e barusell@usp.br (P.S. Baruselli)

Recebido para publicação: 06/09/2006
Aprovado para publicação: 26/06/2007

1 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

2 - Departamento de Apoio e Produção em Saúde Animal, Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba - SP

Resumo

O presente estudo teve como objetivo traçar o perfil de gonadotrofinas em 12 novilhas Nelore, a fim de testar a hipótese de que há declínio nas concentrações de FSH e elevação transitória nos níveis de LH durante a seleção folicular. A partir da ovulação (D0) foram colhidas amostras de sangue da veia jugular a cada 12 horas até o D5, para a dosagem de FSH e LH plasmáticos. Empregou-se o método de radioimunoensaio de duplo anticorpo. A sensibilidade do ensaio de LH foi de 0,02ng/ml e a de FSH de 0,005ng/ml. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram 13,6% e 18,8%, respectivamente. Os dados (média±EPM) foram normalizados para o momento da divergência folicular e, posteriormente, analisados por ANOVA e por regressão linear, cúbica e quadrática. Também foi empregado o Teste t para comparação entre o ponto mais alto e o mais baixo da curva. Não se verificou efeito de tempo sobre as concentrações plasmáticas de FSH e de LH quando se utilizou análise de variância e de regressão. Entretanto, através do Teste t pontual, o FSH atingiu as menores concentrações plasmáticas 36 (0,40±0,05ng/ml) e 60 horas (0,42±0,04ng/ml) após a divergência, comparativamente às 36 horas anteriores ao desvio, quando as concentrações foram máximas (0,63±0,08ng/ml). Conclui-se, portanto, que há declínio nas concentrações plasmáticas de FSH, contudo, não foi comprovada elevação transitória nas concentrações de LH próximo ao momento do desvio folicular em fêmeas Nelore.

Palavras-chave:

Gonadotrofinas hipofisárias.
Gado Nelore.
Radioimunoensaio.
Bovinos.

Introdução

Em bovinos da raça Holandesa o fenômeno da divergência folicular é marcado pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos¹, e está associado a eventos endócrinos e celulares, como o decréscimo dos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH), aumento das concentrações circulantes de 17 β -estradiol, aumento de IGF-I e aumento na expressão de receptores de hormônio luteinizante (LH)².

O FSH está relacionado à emergência da onda de crescimento folicular, momento no qual atinge concentrações máximas³, quando os folículos recrutados apresentam

diâmetro médio de 4mm⁴. Deste momento em diante, as concentrações decrescem até alcançarem o nadir próximo ao desvio, com relatos variando entre 32 horas antes³ até 10 horas após a seleção folicular⁵. Através de estudos *in vitro*, verificou-se que o FSH estimula a produção de estradiol, IGF-I, activina-A e inibina-A.⁶

A queda nos níveis de FSH é causada pela ação combinada da inibina e do estradiol, produzidos por folículos maiores que 5mm⁷, em fêmeas Holandesas, através de retroalimentação negativa⁸ sobre a hipófise⁹. Porém esta ação conjunta dos folículos ocorre somente até a fase de crescimento comum. Após a divergência folicular, apenas o folículo dominante

é o responsável pela inibição desta gonadotrofina.⁶

Em bovinos, o requerimento por FSH ocorre em folículos entre 4 a 9mm e a partir deste diâmetro o folículo dominante continua a se desenvolver devido à mudança na dependência gonadotrófica primária de FSH para LH.⁹ Entretanto, estudos têm demonstrado que o folículo dominante necessita de concentrações basais de FSH para continuar seu desenvolvimento, as quais são inadequadas para folículos menores.⁴

Após a mudança na dependência gonadotrófica, o LH passa a assumir papel fundamental na fase final de crescimento¹⁰ e maturação folicular, e embora uma elevação transitória nas concentrações deste hormônio tenha início 32 horas antes¹¹ até um período de 48 horas após a divergência folicular⁵, seu envolvimento no processo de seleção ainda não está claramente definido. Sabe-se, entretanto, que o LH estimula a produção intrafolicular de esteróides e sistemas de fatores de crescimento que estão envolvidos nos mecanismos de desvio.⁶

Tem-se postulado que o mecanismo de desvio folicular em bovinos envolve a aquisição seletiva de responsividade ao LH pelo folículo dominante.³ No momento esperado do desvio folicular, o número de receptores de FSH nas células da granulosa não se altera no folículo dominante, mas o número de receptores de LH aumenta. Desta forma, o primeiro folículo a alcançar um estágio decisivo na expressão de receptores de LH nas células da granulosa pode ser aquele que se tornará o dominante.¹²

Embora existam inúmeros trabalhos acerca das inter-relações entre as gonadotrofinas e o desenvolvimento folicular no momento ou nas proximidades da divergência folicular, desenvolvidos em bovinos da raça Holandesa, há escassez de estudos em bovinos da raça Nelore ou seus cruzamentos. As raças zebuínas perfazem cerca de 80% dos 136 milhões de cabeças pertencentes ao rebanho de corte nacional¹³, havendo, portanto, demanda por conhecimento em áreas básicas, principalmente fisiologia reprodutiva.

Na literatura vigente constam apenas duas recentes investigações sobre divergência folicular na raça Nelore^{14,15}, sendo que em apenas uma delas¹⁴ foi descrito o perfil de FSH ao longo da primeira onda folicular. No trabalho desta autora, foram realizadas colheitas de sangue a cada 12 horas até o 5º dia após a ovulação, entretanto, não foram verificadas alterações significativas nas concentrações desta gonadotrofina em relação ao momento do desvio folicular. Não foram descritas até o presente momento as oscilações de LH durante a divergência folicular em novilhas Nelore.

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo traçar o perfil de gonadotrofinas, a fim de testar a hipótese de que em fêmeas Nelore há declínio nas concentrações de FSH e elevação transitória nos níveis de LH durante a seleção folicular.

Material e Método

Animais e Protocolo de Sincronização da Ovulação

Foram utilizadas 13 novilhas Nelore (*Bos indicus*) cíclicas, com idade variando entre 20 e 24 meses e peso acima de 325 kg, as quais foram mantidas em regime a pasto (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*) com água *ad libitum*. O experimento foi conduzido na Área de Produção de Bovinos de Corte, da Faculdade de Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga – SP (latitude: 21°59'46''S, longitude: 47°25'33''O).

Os animais foram previamente submetidos ao seguinte protocolo de sincronização de ovulação. Em dia aleatório do ciclo estral, os animais foram tratados com 2mg de Benzoato de Estradiol (BE) IM (Index Farmacêutica, Brasil) e com um implante auricular de Norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil). Oito dias após, os implantes foram removidos e administrou-se 150µg de d-Cloprostenol IM (Preloban®, Intervet, Brasil). Vinte e quatro horas após a retirada dos implantes, as fêmeas receberam 1mg de BE IM.

Colheita de Sangue e Dosagens Hormonais

Em todos os animais foram colhidas amostras de 10 ml de sangue da veia jugular, em tubos heparinizados (Vacutainer®, Becton-Dickinson & Company, EUA), a cada 12 horas a partir da ovulação até o quinto dia, para dosagem de LH e FSH. As amostras foram centrifugadas a 600g durante 15 minutos (Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®, Brasil) e o sobrenadante foi pipetado, dividido em duas alíquotas (uma para cada hormônio) e acondicionado em criotubos para posterior armazenamento em freezer a -20°C. O método empregado foi o de radioimunoensaio de duplo anticorpo, padronizado para bovinos conforme metodologia descrita por Bolt e Rollins¹⁶. Para o ensaio de FSH, utilizou-se o USDA-bFSH para a iodinação, e primeiro anticorpo NIDDK-anti-oFSH-1 a uma diluição de 1:30.000. Para o ensaio de LH, foram utilizados USDA-bLH para a iodinação e primeiro anticorpo NIDDK-anti-o-LH-1 a uma diluição de 1:300.000. A sensibilidade do ensaio de FSH foi de 0,005ng/ml e a de LH de 0,02ng/ml. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram 18,8% e

13,6%, respectivamente.

Análise Estatística

As concentrações plasmáticas de FSH e LH foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Analysis System, do programa estatístico SAS for Windows (versão 8.0, 2000), e foram avaliadas por ANOVA (GLM) e análise de regressão (linear, quadrática e cúbica). Como os dados não seguiram às premissas, os mesmos foram transformados (logaritmo de base 10 – $\log_{10} X$ e raiz quadrada – \sqrt{X}). Realizou-se também a comparação, por teste T, entre o ponto mais alto e o mais baixo da curva de FSH.

Resultados

Os perfis de FSH e LH de novilhas Nelore, normalizados para o momento da divergência folicular (0h), estão ilustrados na figura 1. Um animal foi excluído da análise estatística por se comportar como outlier.

Não houve efeito de momento sobre as concentrações plasmáticas de FSH ($P=0,15$) e de LH ($P=0,80$), quando se

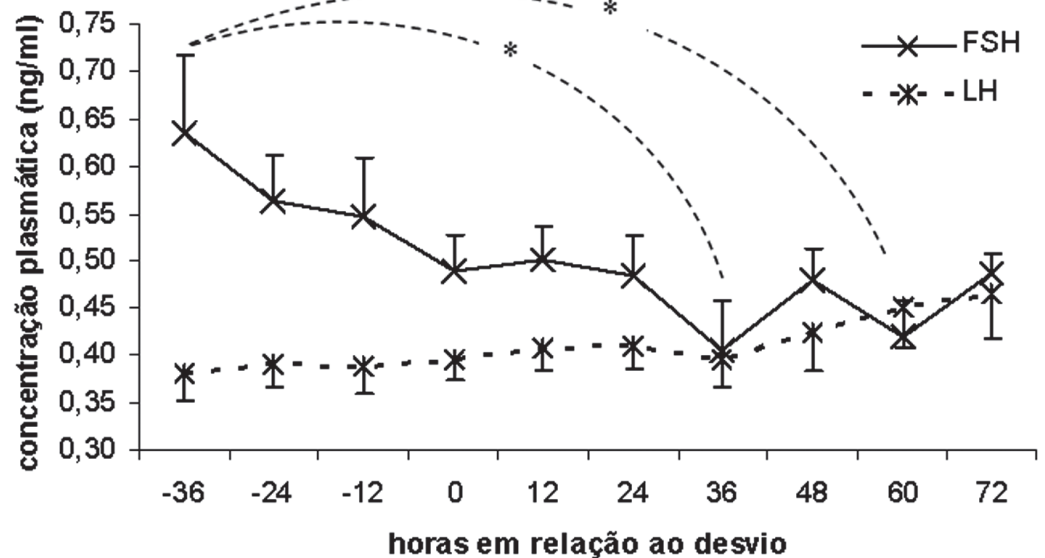


Figura 1 - Concentrações plasmáticas de FSH e de LH normalizadas para o momento do desvio folicular (0h) em novilhas Nelore (n=12). Pirassununga – SP, 2004. * representa diferença estatística entre os pontos ($P<0,05$) para a curva de FSH

procedeu com análise de variância. Entretanto, este efeito foi observado quando se empregou análise de regressão linear em ambas gonadotrofinas ($P=0,004$ e $P=0,005$, respectivamente). Apesar disto, os coeficientes de regressão foram baixos (FSH: $r^2=0,08$; LH: $r^2=0,03$). Adicionalmente, pôde-se demonstrar pela comparação pontual que os níveis de FSH atingiram concentrações máximas 36 horas antes do desvio, comparativamente aos menores valores plasmáticos alcançados 36 e 60 horas após a divergência (0,63ng/ml vs. 0,40ng/ml e 0,42ng/ml; $P<0,05$).

Discussão

Embora uma gama de trabalhos tenha sido conduzida em bovinos da raça Holandesa considerando aspectos endócrinos relacionados ou não à divergência folicular, as concentrações plasmáticas de FSH e LH descritas na literatura apresentam grande variação em decorrência de diferenças entre espécies/ raças, metodologias e períodos do ciclo estral.

Neste grupo genético, os níveis de FSH variam entre 0,2 a 11,5ng/ml antes da divergência.^{12,17,18,19} Após o desvio relata-se queda nos níveis circulantes deste hormônio para aproximadamente 0,1 a 8,5ng/ml.^{3,4,5,17,18,19} Quanto ao LH, os valores oscilam entre 0,5 a 1,5ng/ml.^{3,4,5,20}

Em novilhas Nelore somente dois estudos determinaram as concentrações plasmáticas de FSH ao longo da primeira onda de crescimento folicular.^{14,21} Buratini et al.²¹ encontraram valores que variaram de 0,04ng/ml a <0,3ng/ml, do 3º ao 7º dia do ciclo estral. Contudo, este experimento não foi delineado com o propósito de correlacionar os achados hormonais com a divergência folicular. Concentrações plasmáticas semelhantes às do presente estudo foram relatados por Castilho et al.¹⁴, contudo, os perfis de FSH apresentados por esta autora comportaram-se de maneira diferente em relação ao presente trabalho. Em acordo com trabalhos previamente realizados em *Bos taurus*^{3,5}, os padrões de FSH

do presente estudo apresentaram declínio após a divergência folicular, contrariamente aos dados relatados em *Bos indicus*¹⁴, nos quais houve elevação, embora não estatisticamente significativa, nos níveis desta gonadotrofina. Não foram encontrados dados relativos ao LH em novilhas Nelore cíclicas, contudo, em novilhas pré-púberes se observou aumento nos níveis de LH proporcionalmente ao crescimento destes animais, atingindo concentrações médias de 0,42ng/ml aos 16 meses²². As concentrações plasmáticas de FSH e LH encontradas no presente trabalho foram discretamente superiores às relatadas em estudos anteriores para animais da raça Nelore, e estão dentro dos padrões de bovinos Holandeses.

Pela análise de variância não se observou redução significativa nas concentrações de FSH previamente ao desvio, tampouco elevação transitória nos níveis de LH em torno do período da divergência folicular, contrariamente ao descrito por Ginther et al.^{5,11} e Kulick et al.³, em novilhas Holandesas. Apesar da diferença estatística obtida através de análise de regressão linear, os baixos coeficientes de regressão demonstram que apenas pequena parte do efeito observado é atribuída à variável tempo. Contudo, graficamente é possível visualizar queda nos níveis plasmáticos de FSH, confirmada estatisticamente quando se empregou o Teste t pontual. Talvez o número de animais tenha sido insuficiente para gerar significância estatística nas outras análises e, associado a este fator, a heterogeneidade observada nos perfis de ambas gonadotrofinas nos animais avaliados pode ter conduzido a estes resultados. Ainda, é possível que a adoção de intervalos entre as venopunções a cada 12 horas, contrariamente à metodologia empregada por Ginther et al.¹² (intervalos de 8 horas), possa ter sido insuficiente para demonstrar variações detectáveis no FSH (no caso da análise de variância) ou no LH (em todas as análises). Entretanto, a escolha desta frequência de colheitas de sangue foi proposital, embasada na tentativa de Sartorelli²³ realizar exames ultra-sonográficos

a cada oito horas, ocasionando, na Dissertação deste autor, em estresse causado pelo intenso manejo promovido aos animais.

Embora nestas duas análises não se tenha verificado variação nas concentrações de gonadotrofinas ao longo do tempo em novilhas Nelore, pôde-se demonstrar pela comparação pontual que os níveis de FSH atingiram concentrações máximas 36 horas antes do desvio, comparativamente aos menores valores plasmáticos alcançados 36

e 60 horas após a divergência (0,63ng/ml vs. 0,40ng/ml e 0,42ng/ml; $P < 0,05$).

Conclusões

A hipótese proposta no presente estudo foi parcialmente comprovada. Em fêmeas Nelore há declínio nas concentrações plasmáticas de FSH, contudo, não foi comprovada elevação transitória nas concentrações de LH próximo ao momento do desvio folicular.

Agradecimentos

Ao Campus Administrativo de Pirassununga pela concessão dos animais e ao Professor Doutor Mario Binelli pelas considerações estatísticas.

FSH and LH profiles during follicle deviation in Nelore heifers (*Bos indicus*)

Abstract

Present study aimed to evaluate gonadotropins profiles in 12 Nelore heifers, in order to test the hypothesis that FSH concentrations decrease and LH presents a transient increase during follicle selection. Blood samples from jugular vein were harvested twice daily starting at the time of ovulation (D0) until D5. Plasma samples were assayed for FSH and LH by double antibody radioimmunoassay method. LH and FSH assay sensitivity was 0,02ng/ml and 0,005ng/ml, respectively. The intraassay coefficient of variation was 13,6% and 18,8%, respectively. Data (mean±SEM) were normalized to follicle deviation and analyzed by ANOVA and by linear, cubic, and quadratic regressions. Comparisons between higher and lower FSH values were also performed by T-test. There was no effect of time in plasmatic FSH and LH circulating levels when variance analysis or regression analysis were performed. However, by T-test, FSH concentrations reached the lowest plasmatic levels 36 (0,40±0,05ng/ml) and 60 hours (0,42±0,04ng/ml) after follicular deviation, comparatively to 36 hours before deviation, when the concentrations were maximal (0,63±0,08ng/ml). In conclusion, there is a FSH decrease, although a transient LH elevation has not been confirmed encompassing follicle deviation in Nelore females.

Key words:

Gonadotropins.
Pituitary.
Nelore.
Radioimmunoassay.
Cattle.

Referências

- GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.

- KULICK, L. J. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913-921, 1999.
- GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in

- less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.
- 6 GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.
- 7 GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.
- 8 FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- 9 WEBB, R. et al. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, p. 257-284, 1999.
- 10 DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- 11 GINTHER, O. J. et al. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular wave development in cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 507-519, 1998.
- 12 GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- 13 CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Brasília: CNA, 2005. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 21 nov. 2005.
- 14 CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n.3/4, p. 189-196, 2007.
- 15 SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.
- 16 BOLT, D. J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 146-154, 1983.
- 17 GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.
- 18 GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 345-350, 2001.
- 19 GINTHER, O. J. et al. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v. 124, p. 475-482, 2002.
- 20 GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 197-205, 2001.
- 21 BURATINI JR, J. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.
- 22 NOGUEIRA, G. P. **Puberdade em novilhas Nelore**. 2003. 89 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.
- 23 SARTORELLI, E. S. **Caracterização da fase de desvio folicular em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2003. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.