Perfil de secreção de hormônio luteinizante em novilhas pré-púberes da raça Gir, submetidas a protocolo de indução de ovulação¹

Paola Maria da Silva Rosa², Agostinho Jorge dos Reis Camargo³, Raquel Varella Serapião³, Bruna Rios Coelho Alves⁴, Guilherme de Paula Nogueira⁵, Clara Slade Oliveira^{6,7}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

²Graduanda em Medicina Veterinária – USS/Vassouras. E-mail: paolarosa.vet@gmail.com

³Pesquisador, Pesagro-Rio, Niterói/RJ. E-mail: agostinhocamargo@yahoo.com.br, rserapis@gmail.com

⁴Analista, Embrapa Gado de Leite - Juiz Fora/MG. E-mail: brunariosalves@gmail.com

⁵Pesquisador, Laboratório de Endocrinologia, Unesp/Araçatuba. E-mail: guilhenogueira@gmail.com

⁶Analista, LRA-CESM/Embrapa Gado de Leite, Valença/RJ. E-mail: clara.oliveira@embrapa.br

⁷Orientador

Resumo: O objetivo do estudo foi identificar o padrão de liberação pré-pico de LH, associá-lo ao crescimento folicular e à resposta ovulatória em novilhas pré-púberes da raça Gir, após protocolo hormonal de indução de ovulação. Doze novilhas Gir pré-púberes criadas em mesmas condições de criação receberam dispositivo intravaginal (dia zero = d0) contendo 1,0 g de P4 durante 12 dias. No d12, o dispositivo foi removido e foram injetados (via I.M.) 0,5 mg ECP e 200 IU de eCG. No d13, amostras de sangue foram coletadas a cada 15min durante 6h para se identificar o padrão pré-pico de secreção de LH. Concentrações plasmáticas de LH foram avaliadas por RIA. O protocolo hormonal induziu ovulação em 41,6% das novilhas (5/12). Após a resposta ovulatória, as fêmeas foram agrupadas: "Ovulou" (G1, n=5) e "Não ovulou" (G2, n=7). As concentrações de LH foram analisadas por deconvolução usando o algoritmo Pulse. Os dados obtidos a partir das análises de LH foram comparadas pelo teste T. A concentração média (ng/mL) de LH (G1: $0,80 \pm 0,08$; G2: $0,96 \pm 0,09$; $p = 0,22$), a secreção basal (pg/mL) estimada (G1: $21,6 \pm 2,3$; G2: $25,4 \pm 2,3$; $p = 0,16$) e a amplitude média (pg/mL) dos pulsos de secreção (G1: $16,9 \pm 1,9$; G2: $19,4 \pm 2,3$; $p = 0,26$) não diferiram entre os grupos. No entanto, a frequência (pulsos/h) de pulsos de secreção (G1: $0,30 \pm 0,06$; G2: $0,48 \pm 0,06$, $p = 0,07$) e a massa total (ng) secretada em pulsos (G1: $0,57 \pm 0,14$; G2: $1,07 \pm 0,19$; $p = 0,08$) foi maior no G2. Os resultados sugerem que a resposta ovulatória ao protocolo hormonal utilizado nas novilhas Gir pré púberes está relacionada com uma menor frequência de secreção pulsátil de LH no momento próximo a indução da ovulação. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos para melhor entendimento da dinâmica de secreção pré pico de LH.

Bos Indicus, Maturação sexual, Puberdade

Profile of luteinizing hormone secretion in prepubert Gyr heifers, submitted to ovulation induction protocol

Abstract: The aim of the present study was to identify the pre-peak release pattern of LH, to associate with ovulatory response in Gyr prepubertal heifers after hormonal protocol for ovulation induction. Twelve prepubertal Gyr heifers (18 ± 1.4 months of age) created in the same conditions received an intravaginal device (d0) containing 1.0 g of P4 for 12 days. In d12, the device was removed and 0.5 mg of ECP and 200 IU of eCG were injected (I.M). In d13, blood samples were collected every 15min for 6h to identify the pre-peak pattern of LH secretion. Plasma LH concentrations were assessed by double antibody radioimmunoassay using purified bovine LH. The hormonal protocol induced ovulation in 41.6% of the heifers (5/12), which occurred between d15 and d16. After the ovulatory response, the females were grouped: "Ovulated" (G1, n= 5) and "Non-ovulated" (G2, n= 7). The LH concentrations were analyzed by deconvolution using the Pulse algorithm and the data obtained from the LH analyzes were

compared by the t-test. The mean concentration (ng/mL) of LH (G1: 0.80 ± 0.08 , G2: 0.96 ± 0.09 , $p = 0.22$), estimated basal secretion (pg/mL) (G1: 16.9 ± 1.9 , G2: 21.6 ± 2.3 , G2: 25.4 ± 2.3 , $p = 0.16$) and the mean amplitude (pg/mL) of the secretory pulses (G1: 16.9 ± 1.9 ; G2: 19.4 ± 2.3 , $p = 0.26$) did not differ between groups. However, the frequency (pulses/h) of secretion pulses (G1: 0.30 ± 0.06 , G2: 0.48 ± 0.06 , $p = 0.07$) and the total mass (ng) secreted in pulses (G1: 0.57 ± 0.14 ; G2: 1.07 ± 0.19 ; $p = 0.08$) was higher in G2. The results suggest that the ovulatory response to the hormone protocol used in prepubertal Gyr heifers is related to a lower frequency of pulsatile secretion of LH at the time of ovulation induction. However, further studies should be conducted to better understanding the dynamics of LH pre-peak secretion

Bos Indicus, Puberty, Sexual maturation

Introdução

A puberdade é descrita como a transição do estado anovulatório para a ovulação regular. Sabe-se que próximo a primeira ovulação as fêmeas passam por eventos endócrinos nos quais a liberação e a sensibilidade hormonal é alterada. Nesse processo, o LH responde à perda da sensibilidade hipotalâmica exercida pelo E2, e ocorre o aumento da frequência de pulsos de LH até o pico pré-ovulatório, que acarreta subsequente ovulação (DAY et al., 1984). Acelerar o início da puberdade pode influenciar no aumento da produtividade de animais jovens, através da diminuição do período ocioso que permaneceriam até alcançar a maturidade sexual. O início da puberdade é definido pelas mudanças na fisiologia endócrina que fêmeas pré-púberes passam até a primeira ovulação (CARDOSO E DE PAULA NOGUEIRA, 2007; DAY et al., 1984). Dentre os hormônios mobilizados e que alteram seu perfil de secreção e acarretam a ovulação, o hormônio gonadotrófico LH é um dos principais agentes desse evento. Diversos são os fatores que influenciam os indicadores produtivos de um rebanho, entre eles a puberdade e idade ao primeiro parto. Estas características são moduladas tanto pela raça e composição genética do animal quanto pela nutrição, ganho de peso e adaptação do animal ao ambiente no qual está inserido (ESTILL, 2014). Nesse contexto, a raça Gir é uma das principais raças da subespécie *Bos indicus* utilizada nos sistemas de criação extensiva no Brasil, por possuir rusticidade e suportar as condições tropicais do país. No entanto, estudos que cercam a fisiologia específica da raça ainda são escassos, pois a grande maioria relata a realidade de genótipos *Bos tauros* em sistemas de criação em climas temperados e frios, o que não reflete a fisiologia nem os obstáculos de espécies zebuínas puras ou cruzadas no Brasil. Sendo assim, estudos capazes de identificar particularidades da raça Gir apresentam-se com grande potencial de esclarecer eventos diferenciais dos normalmente descritos na literatura, criando subsídios para melhorar a criação e manejo reprodutivo desses animais, permitindo a diminuição dos custos de produção.

Material e Métodos

O presente trabalho foi aceito sob o protocolo 21/2015 na CEUA- EGL e foi realizado no Campo Experimental de Santa Mônica/Barão de Juparãna-Valença da Embrapa Gado de Leite. Doze novilhas pré-púberes foram submetidas a duas avaliações, com intervalos quinzenais antes do início do tratamento, de diâmetro e tônus uterino (via US/DP-2200 Vet®, Mindray, China), que associados a ausência de corpo lúteo (CL), confirmaram a imaturidade sexual. Os animais receberam um dispositivo intravaginal, no dia zero de tratamento (d0) contendo 1,0 g de Progesterona/P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos, Brasil), e permaneceram com ele por durante 12 dias. No d12, o dispositivo foi removido e foram injetados via Intramuscular 0,5mg de cipionato de estradiol/ECP (ECP®, Zoetis, Campinas, Brasil) e 200IU de Gonadotrofina Coriônica Equina/eCG (Folligon®, Intervet Schering-Plough, Cotia, Brasil). Após a resposta ovulatória, dessa forma a partir desse resultado as fêmeas foram agrupadas em 2 grupos distintos: "Ovulou" (G1, n=5) e "Não ovulou" (G2, n=7), Após 24h do início do tratamento (d13), amostras de sangue foram coletadas, através da punção da veia jugular e o sangue foi depositado em tubo contendo EDTA (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA), imediatamente após as coletas o sangue foi centrifugado a $1.500 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente e o plasma coletado, armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. As coletas foram feitas a cada 15 minutos durante 6 horas (totalizando 25 exemplares) para se identificar o padrão pré-pico de secreção de LH. Os ensaios do hormônio

Luteinizante foram feitas através da técnica de radioimunoensaio RIA descrita por Bolt e Rollins, 1983 e Bolt et al., 1990, com algumas adaptações. Como este foi um estudo preliminar, no qual se obtiveram resultados iniciais, com pequeno número de animais considerou-se o nível de significância de 10%. As concentrações de LH foram analisadas por deconvolução usando o algoritmo Pulse (Software Pulse_XP, versão 20090124, Universidade da Virginia, VA, USA). Os dados obtidos a partir das análises de LH foram comparadas pelo teste t (SAS, Institute Inc., Cary, USA).

Resultados e Discussão

O presente estudo foi conduzido com novilhas Gir, com maior aptidão para leite, e com genótipo zebuino. Refletindo a realidade encontrada em grande parcela dos sistemas leiteiros do Brasil. O protocolo hormonal induziu ovulação em 41,6% das novilhas (5/12), que ocorreram entre d15 e d16. As análises do hormônio luteinizante tiveram como função identificar diferenças no seu perfil de secreção no momento de “pré-pico” do hormônio, entre as fêmeas que alcançaram a maturidade sexual (confirmada pelas ovulações e presença de CL) e as fêmeas que não ovularam (ausência de CL). A concentração média (ng/mL) de LH bem como a (G1: $0,80 \pm 0,08$; G2: $0,96 \pm 0,09$; $p = 0,22$), a secreção basal (pg/mL) estimada (G1: $21,6 \pm 2,3$; G2: $25,4 \pm 2,3$; $p = 0,16$) e a amplitude média (pg/mL) dos pulsos de secreção (G1: $16,9 \pm 1,9$; G2: $19,4 \pm 2,3$; $p = 0,26$), não demonstrou diferença entre os grupos, no entanto, a frequência (pulsos/h) de pulsos de secreção (G1: $0,30 \pm 0,06$; G2: $0,48 \pm 0,06$, $p = 0,07$) e a massa total (ng) secretada em pulsos (G1: $0,57 \pm 0,14$; G2: $1,07 \pm 0,19$; $p = 0,08$) foi maior para o grupo de animais que não responderam (“ovulou”) ao tratamento hormonal. O presente estudo não corrobora com análises encontradas por Day et al., 1984, no qual os resultados indicaram que com a aproximação da ovulação ocorre um aumento gradual e linear tanto da frequência dos pulsos de secreção quanto a média de concentração de LH. Rodrigues et al., 2002, quando analisou a amplitude dos picos não observou diferença em animais pré-púberes e púberes, conforme o resultado encontrado no presente trabalho. O aumento na amplitude de secreção de LH normalmente é esperado por ocorrer quando há um aumento paralelo com a concentração estimada do hormônio, no estudo não houve nenhuma diferença entre os dois parâmetros nos grupos de animais que “ovulou” e “não ovulou”. Uma das teorias que podem explicar de os parâmetros de frequência de pulsos/h e massa total secretada nos pulsos variarem juntos, seria que a massa total secretada no pulsos altera sempre proporcionalmente a frequência dos pulsos/h. No entanto, esses parâmetros são em geral analisados em designs de análises que retratam a progressão dos animais em meses (Rodrigues et al., 2002), ou então são feitas em intervalos curtos (a cada 15min por 10h), porém não captam o momento pré-pico de secreção de LH antes da ovulação (Cardoso et al., 2009).

Conclusões

Os resultados sugerem que protocolos hormonais a base de P4 podem ser utilizados com resultados satisfatórios em novilhas pré-púberes da raça Gir e que a resposta ovulatória ao protocolo hormonal utilizado nesses animais não está relacionada com os níveis de LH secretados ao longo dos momentos analisados, mas está correlacionado com uma menor frequência de secreção pulsátil de LH e o potencial de secreção no momento dos pulsos. No entanto, maiores estudos devem ser conduzidos para melhor entendimento da dinâmica de secreção pré pico de LH, aumentando-se o número de animais para confirmar o perfil de secreção diferencial da raça.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio e auxílio financeiro concedido pela Embrapa e CNPq para realização desse trabalho.

Referências

BOLT, D. J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. *J Anim Sci*, v. 56, n. 1, p. 146-54, Jan 1983. ISSN 0021-8812.

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 23, n. 4, p.

263-271, 1990/12/01/ 1990. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209090040M> > .

CARDOSO, D.; DE PAULA NOGUEIRA, G. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 10, n. 1, p. 59-68. 1982-1131, 2007.

CARDOSO, D.; FERREIRA, G. F.; NOGUEIRA, G. P. Concentração de LH em novilhas da raça Nelore da desmama à primeira ovulação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1277-1284, 2009. ISSN 1809-6891.

CLARO, I. et al. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 903-11, Oct 2010. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494432> > .

DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biol Reprod**, v. 31, n. 2, p. 332-41, Sep 1984. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6478017> > .

JOHNSON, S. K.; SMITH, M. F.; ELMORE, R. G. Effect of unilateral ovariectomy and injection of bovine follicular fluid on gonadotropin secretion and compensatory ovarian hypertrophy in prepuberal heifers. **J Anim Sci**, v. 60, n. 4, p. 1055-60, Apr 1985. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3921512> > .

ROBERSON, M. S. et al. Steady-state amounts of alpha- and luteinizing hormone (LH) beta-subunit messenger ribonucleic acids are uncoupled from pulsatility of LH secretion during sexual maturation of the heifer. **Biol Reprod**, v. 46, n. 3, p. 435-41, Mar 1992. ISSN 0006-3363.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biol Reprod**, v. 66, n. 3, p. 603-9, Mar 2002. ISSN 0006-3363