

Diets Ricas em Ácidos Graxos Poli-insaturados Alteram os Níveis Plasmáticos de Testosterona em Carneiros?

José Eduardo Matos¹, Carolinna Florido², Tarsizio da Silva Santos³, Rebeca Santos da Silva⁴, Maiana Silva Chaves⁵, Ana Claudia França de Freitas⁶, Pábola Santos Nascimento⁷, Allan Andrade Rezende⁸, Alexandre Nizio Maria⁹, Anselmo Domingos Ferreira dos Santos¹⁰, Claudio Alvarenga de Oliveira¹¹, Hymerson Costa Azevedo¹²

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dietas com diferentes concentrações de ácidos graxos poli-insaturados complexados com sais de cálcio (AGP-Ca+) sobre os níveis plasmáticos de testosterona em carneiros. Foram utilizados 24 carneiros da raça Santa Inês distribuídos em quatro grupos experimentais que se diferiram na quantidade oferecida de AGP-Ca+ a partir da ingestão de uma dieta base como segue: G3 – grupo controle, sem adição de AGP-Ca+ e com 3% de estrato etéreo (EE), G6, G9 e G12 com a adição de AGP-Ca+ e 6, 9 e 12% de EE, respectivamente. Amostras de sangue dos

¹ Zootecnista, mestre em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE. eduardomatos@zootecnista.com.br.

² Graduanda em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, floridovet@gmail.com.

³ Biólogo, mestre - Biotecnologia, UFS, São Cristóvão, SE. tbiotec@hotmail.com.

⁴ Veterinária, mestranda da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE. beca19silva@hotmail.com.

⁵ Veterinária, mestranda da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, maiana-@hotmail.com.

⁶ Veterinária, mestranda da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, aninha_brrs@hotmail.com.

⁷ Veterinária, mestranda da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, pabolasn@hotmail.com.

⁸ Veterinário, mestrando - Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. allan_a.rezende@hotmail.com.

⁹ Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, alexandre.maria@embrapa.br.

¹⁰ Veterinário, doutor -Zootecnia, docente - UFS, São Cristóvão, SE. anselmosantos@ufs.br.

¹¹ Veterinário, pós-doutorado em Endocrinologia Reprodutiva Animal, docente da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, cadolive@usp.br.

¹² Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, hymerson.azevedo@embrapa.br.

carneiros foram colhidas por punção venosa da veia jugular para obtenção de plasma e análise por radioimunoensaio, nos momentos zero (M0), 30 (M30), 60 (M60) e 90 (M90) da administração das dietas experimentais. Não foram observadas influências ($p > 0,05$) do grupo experimental e da interação entre grupo e momento sobre a testosterona. Contudo, o momento influenciou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de testosterona, com as maiores concentrações observadas a partir do M60. Os resultados do presente estudo sugerem que a adição de ácidos graxos poli-insaturados complexados com sais de cálcio à dieta de carneiros reprodutores com teores de até 12% de extrato etéreo não promove aumento nos níveis de testosterona, sendo recomendada a suplementação de carneiros reprodutores com antecedência mínima de 60 dias da sua utilização.

Palavras-chave: ovinos, gordura protegida, extrato etéreo, ácido linoleico, ácido linolênico.

Introdução

O desempenho reprodutivo dos ovinos pode ser influenciado pelo estado nutricional do animal (COOP, 1966). Apesar da frequente abordagem a respeito dos aspectos relacionados à nutrição de ovelhas utilizando, por exemplo, o flushing com objetivo de obter ganhos reprodutivos, observa-se uma nítida escassez de estudos sobre o efeito nutricional na fertilidade de reprodutores ovinos (TUFARELLI et al., 2011) especialmente de raças brasileiras naturalizadas como a Santa Inês.

O estado nutricional é o fator mais relevante por sua atuação no eixo hipotalâmico-hipofisário, no qual o hipotálamo, por meio do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimula a hipófise anterior a secretar os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Em machos adultos o FSH atua nas fases iniciais da espermatogênese e o LH, atua nas células de Leydig, presentes nos testículos, as quais são responsáveis pela produção de testosterona, que por sua vez, estimula o desenvolvimento dos testículos e os últimos estágios da espermatogênese, prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo, promove o crescimento e o desenvolvimento da atividade

secretora dos órgãos sexuais acessórios (GARNER e HAFEZ, 1995; HASCHEK et al., 2010).

Assim, o aumento da testosterona circulante pode contribuir para a melhoria da qualidade seminal visto que o ejaculado formado a partir das contribuições dos testículos e glândulas acessórias serve como veículo e fonte de substâncias vitais à manutenção e capacidade fertilizante do espermatozoide (GUYTON e HALL, 2006).

A testosterona interfere diretamente na libido e, conseqüentemente, no número de serviços (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Em carneiros adultos, o comportamento sexual é mais influenciado pelos níveis de testosterona plasmática do que pelo fato de o animal ser previamente exposto à fêmea ou não, além disso, os machos com maior concentração de testosterona investem muito mais tempo em atividade sexual, apresentando maior expressão do comportamento de monta e no número de ejaculações (ROSA et al., 2000).

Os efeitos da nutrição de machos com uso de dietas hipercalóricas é geralmente relatada em testes de desempenho ou na preparação de cordeiros para exposições ou leilões sem a preocupação direta com os aspectos reprodutivos (KHERADMAND et al., 2006). O aumento da ingestão de energia e proteína promove ganho de peso, induzindo a uma elevação na frequência de picos de GnRH e a maiores pulsos do LH, dentro de poucos dias (BLANCHE et al., 2000). Os ácidos graxos da dieta são degradados a núcleos de esterol, os quais, servem de base para a síntese da testosterona (GUYTON e HALL, 2006).

A nutrição dos ruminantes com fontes de lipídios pode elevar o teor de energia, melhorando o desempenho produtivo dos animais (GRUNERT et al., 2005), entretanto, as características lipídicas da dieta como, por exemplo, o comprimento da cadeia, o grau de insaturação, e a posição da ligação dupla na cadeia acil dos ácidos graxos têm efeitos significativos sobre as funções desses lipídios nos processos reprodutivos (MATTOS et al., 2000; SANTOS et al., 2008). Dietas compostas por ácidos graxos de cadeia longa aumentam a produção de propionato em nível de rúmen, resultando na elevação das concentrações plasmáticas de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I). Tais metabólitos favorecem a reprodução, pois atuam no

sistema nervoso central, influenciando a secreção de GnRH (WILLIAMS, 1996; LAMMOGLIA et al., 1997).

O uso de ácidos graxos complexados com sais de cálcio (AGP-Ca⁺), que são suplementos alimentares de origem vegetal utilizados na nutrição de ruminantes, têm-se apresentado como alternativa para elevar a densidade energética da dieta sem afetar a fermentação ruminal (CHALUPA et al., 1986). Devido a sua elevada estabilidade, o AGP-Ca⁺ é digerido apenas em meio ácido, passando pelo rúmen sem sofrer digestão, pois o pH está em torno de 6,5 a 7,0 sendo degradado no abomaso que tem pH ácido de 2 a 3, ocorrendo o desdobramento da gordura, liberação dos ácidos graxos e íons de cálcio para o intestino onde serão absorvidos. Os AGP-Ca⁺ consistem basicamente de ácidos linoleico (n-6) e α -linolênico (n-3), que são essenciais, importantes para formação dos componentes de membrana e precursores de moléculas regulatórias (JENKINS, 1993).

O presente estudo se propôs avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácidos graxos poli-insaturados complexados com sais de cálcio (AGP-Ca⁺) na dieta sobre os níveis plasmáticos de testosterona em carneiros da raça Santa Inês.

Material e Métodos

O estudo se desenvolveu nas instalações da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Campo Experimental Pedro Arle, município de Frei Paulo, Sergipe. Para tal, contou-se com a participação de 24 carneiros da raça Santa Inês com 22 meses de idade, divididos em quatro grupos aleatórios e de igual tamanho. Cada grupo recebeu diferentes dietas a partir de uma formulação base com 3% de EE (controle) e, da adição de AGP-Ca⁺ até a obtenção de 6,9 e 12% de EE (Grupos: G3, G6, G9 e G12, respectivamente).

Após uma semana de adaptações com a dieta base (controle) ofertada a todos os carneiros, as dietas experimentais foram fornecidas por 90 dias. A fim de permitir maior controle e correção da dieta, os animais foram alojados em baias individuais, onde eram alimentados, com a dieta correspondente ao seu grupo, duas vezes ao dia – às 6 horas e às 15 horas. O consumo da dieta era ajustado

diariamente conforme o apetite do animal experimental, sendo livre o acesso à água.

Para determinar as concentrações séricas de testosterona nos animais, amostras de sangue dos carneiros foram colhidas por punção venosa da veia jugular em tubos a vácuo com EDTA, nos dias 0 (M0), 30 (M30), 60 (M60) e 90 (M90) da administração das dietas experimentais, sempre pela manhã, pré-prandial. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, por 20 minutos, para obtenção do plasma que, posteriormente, foi analisado pela técnica de radioimunensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina veterinário e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Os dados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA e por análise de regressão sendo considerado 5% como nível de significância.

Resultados e Discussão

Não foi observada influência ($p > 0,05$) do grupo experimental e da interação entre grupo e momento sobre a testosterona (Tabela 1). Contudo, o momento influenciou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de testosterona.

Não foram observados incrementos nos níveis plasmáticos de testosterona relacionados às concentrações de ácidos graxos das dietas experimentais. Provavelmente o teor de 3% de estrato estéreo na dieta do grupo controle foi suficiente para que os carneiros expressassem seus potenciais esteroidogênicos, assim, o aumento nos níveis energéticos da alimentação não teria surtido efeito adicional sobre a concentração de testosterona.

Tabela 1. Valores médios dos níveis plasmáticos de testosterona (ng/mL) por grupo de carneiros alimentados com diferentes níveis de sais de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados (AGP-Ca+) na dieta.

Grupos ¹	Momentos ²				
	M0	M30	M60	M90	Médias
G3	2,37 ± 2,58	3,75 ± 3,01	6,68 ± 2,83	5,99 ± 2,29	4,69 ± 3,07
G6	2,29 ± 2,99	5,97 ± 2,97	10,46 ± 3,9	8,16 ± 2,94	6,72 ± 4,30
G9	3,67 ± 3,50	6,09 ± 3,41	7,72 ± 2,87	8,14 ± 5,87	6,41 ± 4,20
G12	5,66 ± 1,99	6,22 ± 1,05	7,92 ± 2,34	4,95 ± 3,79	6,18 ± 2,58
Médias	3,49 ± 2,97 ^c	5,50 ± 2,78 ^b	8,19 ± 3,17 ^a	6,81 ± 3,96 ^a	

¹ G3 = dieta sem AGP-Ca+ e 3% de extrato etéreo (EE); G6, G9 e G12 = dietas com AGP-Ca+ e 6, 9 e 12% de EE;

² M0, M30, M60 e M90 = momento zero, 30, 60 e 90 dias da administração das dietas, respectivamente; Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Outro ponto a ser considerado é o fato da fonte de AGP-Ca⁺ utilizada neste trabalho (Megalac-E[®]), apresentar uma composição mínima de extrato etéreo de 85%, sendo destes 45% de ácido linoleico (C18:2n6) e 6% de ácido linolênico (C18:3n3) (ARM & HAMMER, 2006). Esmaeili et al. (2014), trabalhando com diferentes dietas a base de óleo de palma, óleo de girassol e óleo de peixe, não verificaram efeitos da dieta com óleo de girassol, rica em ácido linoleico, sobre os níveis de testosterona. Em contrapartida, os referidos autores observaram que óleo de peixe, rico em ácido linolênico, apresentou o melhor resultado entre os valores totais de testosterona. O ácido linolênico relaciona-se positivamente com a composição plasmática das membranas testiculares e espermáticas, altera a expressão e a afinidade dos receptores de gonadotrofinas, além de influenciar a síntese de testosterona, sustentando a hipótese de que possui maiores efeitos sobre a reprodução, se comparado ao ácido linoleico (SPEAKE et al., 2003; SAMADIAN et al., 2010). Provavelmente os baixos teores de n3 na fonte de AGP-Ca+ utilizada neste trabalho não foram suficientes para promover os efeitos benéficos deste ácido graxo sobre a reprodução.

A análise de regressão ($y = -0,03845x^2 + 0,871601x + 2,449441$, $r^2 = 87,21\%$), indicou que, independentemente dos grupos, a testosterona aumentou ($p < 0,05$) gradativamente ao longo do período de administração das dietas até o M60, estabilizando-se ($p > 0,05$) até o final do experimento. Os efeitos

da nutrição sobre as funções reprodutivas em carneiros podem ocorrer por dois processos fisiológicos: (i) através dos centros metabólicos e reprodutivos do cérebro, levando a uma mudança na liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e; (ii) através de outras vias do sistema endócrino independentes do GnRH ou pelo metabolismo testicular (LINDSAY et al., 1993; MARTIN et al., 2010). Uma vez que a resposta do GnRH a uma mudança abrupta na nutrição é inicialmente rápida e robusta, decrescendo após três semanas (BLANCHE et al., 2000; MARTIN et al., 2010), o aumento observado na testosterona após o início (M0) até os 60 dias (M60) da administração das dietas, provavelmente foi devido a fatores independentes deste hormônio. A elevação transitória dos níveis de hormônio luteinizante (LH) induzido pela dieta pode levar ao aumento da massa testicular (BLACHE et al., 2000; MARTIN et al., 2010), que por sua vez pode contribuir para um incremento nos níveis de testosterona e conseqüentemente estímulo à secreção do hormônio do crescimento e à espermatogênese (GUYTON e HALL, 2006). Contudo, é importante salientar que os mecanismos cerebrais que conectam o estado nutricional e a atividade do GnRH são ainda pouco compreendidos, assim, os efeitos endócrinos relacionados às alterações sofridas no metabolismo testicular raramente são observadas (MARTIN et al., 2010).

A partir de 60 dias da administração das dietas é que foi observado o maior nível de testosterona e este fato coincide com a duração do período da espermatogênese somado ao tempo gasto pelo espermatozoide no trânsito epididimário em ovinos, que é de aproximadamente 60 a 70 dias (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008). Portanto, infere-se que a suplementação alimentar de carneiros, deva ser feita com antecedência mínima de 60 dias antes da sua utilização na reprodução, para que se obtenham possíveis benefícios oriundos do aumento da síntese de testosterona sobre o desempenho reprodutivo e produção espermática.

Conclusões

A adição de ácidos graxos poli-insaturados complexados com sais de cálcio à dieta de carneiros reprodutores com teores de até 12% de estrato etéreo não promove aumento nos níveis de testosterona. Maiores concentrações de testosterona plasmática são observadas ao longo do tempo da administração de

dietas com 3 a 12% de estrato etéreo, sendo recomendada a suplementação de carneiros reprodutores com antecedência mínima de 60 dias para sua utilização.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, CAPES e FAPITEC pelas bolsas de graduação, mestrado e pós-doutorado, ao Banco do Nordeste pelo apoio financeiro, a EMBRAPA por ceder suas instalações, animais e suporte técnico e, a equipe do LABRA e do Laboratório de Dosagens Hormonais do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, pela colaboração técnica e científica.

Referências

ARM & HAMMER, ANIMAL NUTRITION GROUP. **Gordura protegida ruminal**. Rio de Janeiro: QGN Quimica Geral do Nordeste S.A., 2006. 10 p.

BLACHE, D.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G. B.. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep (Review). **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 120, p. 1-11, 2000.

CHALUPA, W.; VECCIARELLI, B.; ELSER, E. Ruminal fermentation "in vitro" of long chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 5, p. 1293-1303, 1986.

COOP, I.E. Effect of flushing on reproductive performance of ewes. **Journal of Agriculture Science**, v. 67, p. 305-323, 1966.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. Fisiologia reprodutiva do macho. In: **Tratado de fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008. 523 p.

ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A. H.; ALIZADEH, A. R.; ALIPOUR, H.; CHEHRAZI, M. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia**, v. 46, p. 42-49, 2014.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 1995. p. 167-190.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos: Ginecologia**. São Paulo: Varela, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri: Manole, 2004. 582p.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLIG, M. A. Male Reproductive System. In: **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. Oxford, UK: Elsevier, 2010. p. 553-597.

JENKINS, T. C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 3851-3863, 1993.

KHERADMAND, A; BABAEI, H.; BATAVANI, R. A. Effect of improved diet on sêmen quality and scrotal circumference in the ram. **Veterinarski Arhiv**, v. 6, n. 4, p. 333-341, 2006.

LAMMOGLIA, M. A.; WILLARD, S. T.; OLDHAM, J. R. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular pattern, and postpartum reproduction in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.74, p. 2253-2262, 1997.

LINDSAY, D. R.; MARTIN, G. B.; WILLIAMS, I. H.. Nutrition and reproduction. In: **Reproduction in Domesticated Animals**. Amsterdam: GJ King. Elsevier, 1993. p 459-491.

MARTIN, G. B.; BLACHE, D.; MILLER, D. W.; VERCOE, P. E.. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1214-1222, 2010.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38-45, 2000.
ROSA, H. J. D.; JUNIPER, D. T.; BRYANT, M. J. The effect of exposure to oestrous ewes on ram's sexual behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. **Appl Anim Behav Sci**, v. 67, p. 293-305, 2000.

SAMADIAN, F.; TOWHIDI, A.; REZAYAZDI, K.; BAHREINI, M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. **Animal**, v. 4, p. 2017–2022, 2010.

SANTOS, J. E. P.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W. Long chain fatty acids as factors influencing reproduction cattle. **Reproduction in Domestic animals**, v.43, p. 23-30, 2008.

SPEAKE, B. K.; SURAI, P.F.; ROOKE, J.A.. Regulation of avian and mammalian sperm production by dietary fatty acids. In: De Vriese S. R., Christophe A. B. (Eds.). **Male Fertility and Lipid Metabolism**. The American Oil Chemists Society Press, Urbana: USA, 2003. p. 96–117.

TUFARELLI, V.; LACALANDRA, G. M.; AIUDI, G. et al. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, p. 339-345, 2011.

WILLIAMS, G. L. Influence of dietary fat intake and metabolism on follicular growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 539-542, 1996.