



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

RESPOSTAS DE INSULINA, IGF-1, T₃, T₄ E CORTISOL
EM OVELHAS SUBMETIDAS A *FLUSHING* DE CURTO E
LONGO PRAZO

Heliton Franco Pereira

CAMPO GRANDE, MS
2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**RESPOSTAS DE INSULINA, IGF-1, T₃, T₄ E CORTISOL EM
OVELHAS SUBMETIDAS A *FLUSHING* DE CURTO E
LONGO PRAZO**

*Responses of insulin, IGF-1, T₃, T₄ and cortisol in sheep under the
flushing of short and long time*

Heliton Franco Pereira

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Maria Inês Lenz Souza

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2013

HELITON FRANCO PEREIRA

**RESPOSTAS DE INSULINA, IGF-1, T₃, T₄ E CORTISOL EM OVELHAS
SUBMETIDAS A *FLUSHING* DE CURTO E LONGO PRAZO**

Responses of insulin, IGF-1, T₃, T₄ and cortisol in sheep under the *flushing* of
short and long time

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

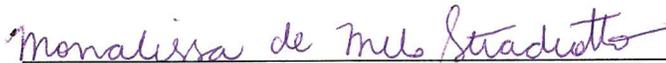
Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado (a) em: 29/07/2013

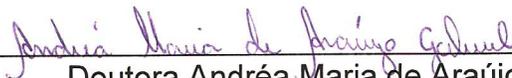
BANCA EXAMINADORA:



Doutora Dra. Maria Inês Lenz Souza
(UFMS) - (Orientadora)



Doutora Monalissa de Melo Stradiotto
UCDB



Doutora Andréa Maria de Araújo Gabriel
UFGD



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Dedico

A Deus, Nossa Senhora do Perpétuo Socorro e Jesus
Cristo

À minha esposa e família



AGRADECIMENTOS

À orientadora, Profa. Dra. Maria Inês Lenz Souza, pela sua dedicação e empenho na orientação e análise deste trabalho. E, ainda, pela paciência, divisão de conhecimento e receptividade quando a procurei para que me orientasse.

A todos os professores das disciplinas realizadas ao longo do curso de Pós-graduação em Ciência Animal.

À CAPES, por fornecer a bolsa de estudo ao decorrer do curso.

Aos colaboradores deste trabalho, na busca de dados para estabelecerem nossos resultados, em especial ao Marcelo Gressler.

À minha esposa Amanda Pereira, pela paciência e apoio em todo decorrer do curso.

Aos meu sogro e sogra, que tanto me apoiam e incentivam na busca de novos horizontes.

Aos colegas de pós-graduação, compartilhando experiências ao longo do curso.

Aos colegas de orientação, Orlando Shiro Júnior e Lorena Rosa.

Aos Coordenadores e secretariado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela ajuda fornecida.

À minha mãe Arnalda Franco e segundo pai Almir de Almeida, pelo grande apoio nos momentos de concretização do curso.

Ao meu pai Genival Pereira, pela dedicação na concretização deste curso.



RESUMO

PEREIRA, H.F. Respostas de insulina, IGF-1, T₃, T₄ e cortisol em ovelhas submetidas a *flushing* de curto e longo prazo. 2013. Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de suplementação com *flushing* no início da estação reprodutiva, sobre os perfis de hormônios metabólicos, estradiol, maior folículo e peso corporal de fêmeas ovinas destinadas à reprodução. Utilizaram-se 30 ovelhas Santa Inês adultas, cíclicas, com escore corporal de 2,5 a 3,0, distribuídas em dois grupos de 15 animais. No grupo 30 dias (G₃₀), as ovelhas foram mantidas em pastagem de grama batatais (*Paspalum notatum flueggé*) e suplementadas com silagem de milho uma vez ao dia, durante 30 dias pré-cobertura. No grupo sete dias (G₇), permaneceram em pastagem de grama batatais, sem suplementação, até nove dias antes da cobertura, quando passaram a receber uma suplementação de concentrado com alto teor energético (milho moído), uma vez ao dia, por uma semana. O sangue foi colhido ao início e final da suplementação e no dia do estro, para quantificação sérica de triiodotironina (T₃), tiroxina (T₄), IGF-1, insulina, cortisol e estradiol. O tamanho do maior folículo em cada ovário foi medido por ultrassonografia no dia do estro. Após análise estatística verificou-se que os perfis hormonais mostraram-se similares nos dois grupos, compatíveis com equilíbrio metabólico, nutricional e reprodutivo, tendo concentrações maiores (exceto para T₃) no início do *flushing* no G₃₀ e no estro no G₇. O G₃₀ ganhou peso ao longo do *flushing*. As concentrações séricas de estradiol e o tamanho do maior folículo nos ovários não variaram entre as dietas. Em conclusão, o uso de *flushing* no início da estação reprodutiva, seja com silagem de milho em longo prazo ou com milho moído em curto prazo, apresenta resultados semelhantes sobre os perfis de hormônios metabólicos de T₃, T₄, IGF-1, insulina e cortisol, representando uma alternativa viável para a preparação das ovelhas para a reprodução, uma vez que os ovários das mesmas continham folículos igualmente estrogênicos.

Palavras chave: Dietas. Hormônios. Folículo. Reprodução. Estradiol.



ABSTRACT

PEREIRA, H.F. Response of T₃, T₄, IGF-1, insulin and cortisol in sheep under the flushing of short and long time. 2013. Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The objective of this study was to evaluate effect of the time of supplementation at early reproductive season, on profile of metabolic hormones, estradiol, large follicle and body weight to ewes for breeding. Thirty adult cyclic Santa Inês with body condition scores around 2,5 and 3 were used, the sheep was separated into groups of 15 animals. At the thirty days group (G₃₀), the ewe were kept grazing on batatais (*Paspalum notatum flueggé*) grass and supplemented with corn silage once a day, during 30 days before the breeding period. The seven days group (G₇), the animals were grazed on batatais grass, without supplementation until nine days before breeding, from this time these sheep were supplemented with high energy diet (ground corn), once a day, during one week. Blood was collected at the beginning and at the end of the supplementation, and at the estrus day, to quantify serum triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), IGF-1, insulin, cortisol and estradiol. The size of large follicle in each ovary it was measured by ultrasound on day estrous. After statistical analysis was verified that hormonal profile remained in the physiological limits at the both groups, consistent with metabolic, nutritional and reproductive balance and G₃₀ gained weight during the period of *flushing*. Oestradiol serum concentrations and follicle diameter in the ovaries were not different between diets. Oestradiol serum concentrations follicle diameter in the ovaries were not different between diets. In conclusion, the use of flushing at the beginning of breeding season either with corn silage a long time or with ground corn a short time, it shows similar results on profiles of metabolic hormones T₃, T₄, IGF-1, insulin and cortisol representing a viable alternative for the preparation of sheep for reproduction, once a time the ovaries of her also contained follicles equally oestrogen.

Keywords: Diet. Hormones. Follicle. Reproduction. Estradiol.



Lista de tabelas

Tabela 1 - Médias \pm Erro padrão da média do peso corporal (kg) e do escore de condição corporal (ECC; 0-5) de ovelhas Santa Inês, suplementadas com <i>flushing</i> de trinta dias e de sete dias, nos dias de início e término do <i>flushing</i> , Fátima do Sul, MS.....	33
Tabela 2 - Médias \pm Erro padrão da concentração dos hormônios T ₃ , T ₄ , IGF-1, insulina e cortisol em ovelhas Santa Inês, suplementadas com <i>flushing</i> de trinta dias e de sete dias, nos dias de início e término do <i>flushing</i> e no dia do estro, Fátima do Sul, MS.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
REFERÊNCIAS	25
Respostas de insulina, IGF-1, T₃, T₄, cortisol e estradiol em ovelhas submetidas a <i>flushing</i> de curto e longo prazo.....	29
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados e Discussão	32
Conclusão.....	40
Agradecimentos	40
Referências.....	40

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem-se desenvolvendo rapidamente em muitos aspectos de produtividade, impulsionada por uma crescente demanda de mercado, o que torna necessária uma reavaliação e modificações dos sistemas tradicionais de exploração, permitindo um maior nível de eficiência e rentabilidade, e o suprimento da demanda potencial existente. A população dos grandes centros consumidores, com sua diversidade racial e de hábitos, promove o crescimento no consumo de carne ovina, expandindo também o mercado para Zse um leque maior de perspectivas para a ovinocultura brasileira, especialmente tipo carne, a qual representa uma opção de diversificação da atividade rural para os pequenos e médios produtores, com amplo plano de expansão.

Atualmente, com a intensificação da ovinocultura no Estado de Mato Grosso do Sul, há necessidade dos produtores buscarem eficiência produtiva para garantir o abastecimento do mercado consumidor interno e, posteriormente, externo. Assim sendo, a otimização da eficiência reprodutiva deve ser um objetivo principal dos criadores, no intuito de alcançarem alta produtividade, atingindo as metas de qualidade exigidas pelos frigoríficos, melhorando o desempenho e a lucratividade da atividade. Para tal, é fundamental o estudo de tecnologias que possam ser implementadas por estes produtores com custo e manejo reduzidos e que, efetivamente, resultem em engrandecimento nos índices produtivos e reprodutivos do rebanho.

Variações nas concentrações hormonais permitem aos animais adaptarem seu balanço metabólico às diferentes condições ambientais, às modificações nos nutrientes e sua utilização, e às alterações homeoréticas durante diferentes fases fisiológicas (TODINI, 2007). O manejo reprodutivo deve ser adequado para garantir um suprimento alimentar da forragem que preencha os requerimentos nutricionais dos animais (ROCHE et al., 2011).

Em latitudes entre 35°S e 35°N, a estratégia reprodutiva não é baseada somente no fotoperíodo, pois são regiões caracterizadas por estacionalidade na disponibilidade alimentar, ocorrendo perda de peso dos animais no outono, considerada a época mais favorável para estação reprodutiva com monta natural. Nestes locais, o fotoperíodo pode ser modulado por outros fatores ambientais (como nutrição) ou sociais (como efeito macho ou contato permanente entre machos e fêmeas), permitindo uma produção mais intensiva e programas de parição acelerados (FORCADA; ABECIA, 2006). É importante o conhecimento dos efeitos provocados por dietas de *flushing*, nos animais criados a campo, em termos de perfis bioquímicos e hormonais, dinâmica folicular e índices de produtividade, visando o

estabelecimento de técnicas simples de manejo que possam ser difundidas aos produtores e prontamente utilizadas por eles, trazendo retorno econômico na forma de mais cordeiros produzidos em relação à área e ao número de fêmeas utilizadas.

O *flushing* é uma tecnologia de manejo eficiente e de baixo custo que, ao possibilitar uma maior taxa de ovulação e, conseqüentemente, uma melhor eficiência reprodutiva, otimiza a produção de cordeiros. Dobson et al. (2012) citaram que Clark, em 1934, já trabalhava em experimentos com utilização de *flushing* no manejo reprodutivo ovino. Coop (1966) já preconizava o uso do *flushing* por seus efeitos positivos sobre a produção de cordeiros. As variações nutricionais afetam o metabolismo, diretamente, por determinar o substrato exógeno para os processos celulares e, indiretamente, através da estimulação ou inibição de fatores neuroendócrinos de regulação metabólica (VIÑALES et al., 2005; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008; SGORLON et al., 2008).

Os nutrientes da dieta promovem a expressão das vias metabólicas que habilitam os animais a alcançarem seu potencial genético para produção e reprodução (MARTIN et al., 2004; BLACHE et al., 2008). Em ruminantes, a nutrição é uma das entradas exógenas de sinais que afetam a função reprodutiva em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (SCARAMUZZI et al., 2006; MEZA-HERRERA et al., 2007; BLACHE et al., 2008; SAMADI et al., 2013). A ligação entre os sistemas metabólico-nutricional e reprodutivo envolve um ou mais hormônios metabólicos, fluxo de nutrientes e a homeostase nutricional (SCARAMUZZI et al., 2006). As influências significativas exercidas pela nutrição sobre a função reprodutiva dão-se através de modificações no peso e na condição corporal, afetando os processos reprodutivos de foliculogênese e esteroidogênese (RHIND; McNEILLY, 1998; VILLA et al., 2009). Isso ocorre com a utilização de dietas com altos níveis de energia ou de proteínas (ZINN; PLASCENCIA, 1996; BLACHE et al., 2006; FORCADA; ABECIA, 2006; MEZA-HERRERA et al., 2007). Rápidas modificações na composição da dieta podem afetar a homeostase metabólica e oxidativa das fêmeas (SGORLON et al., 2008). A nutrição é um dos fatores mais importantes que afetam a taxa de ovulação (RHIND; McNEILLY, 1998; VIÑALES et al., 2005).

Assim buscou-se estudar formas de aplicação do *flushing*, direcionadas às condições de criação já existentes na maioria das propriedades, sem sofrer influências da qualidade zootécnica do rebanho e sem necessidade de grandes ajustes de manejo e mão-de-obra.

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de dois períodos de suplementação com *flushing* de curto e longo prazos, sobre as concentrações dos hormônios metabólicos (insulina, fator de crescimento semelhante à insulina - IGF-1, triiodotironina - T₃, tiroxina - T₄ e

cortisol), e de estradiol (E₂), maior folículo ovariano e peso corporal de fêmeas ovinas destinadas à reprodução.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em regiões próximas ao Equador, o fotoperíodo pode variar imperceptivelmente, onde o ciclo reprodutivo é modificado pelas respostas a outros fatores ambientais ou sócio-sexuais (FORCADA; ABECIA, 2006; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008). Ainda que o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas esteja em equilíbrio, o balanço pode ser influenciado por fatores exteroceptivos, tais como a nutrição, os sinais sócio-sexuais e o fotoperíodo, e muitas das respostas do sistema hipotálamo-hipófise aos sinais nutricionais e sócio-sexuais dependem do grau no qual o genótipo do animal responde ao fotoperíodo (MARTIN et al., 2004; SCARAMUZZI; MARTIN, 2008). Animais estacionais apresentam ciclos anuais de peso corporal, conteúdo de gordura, ingestão alimentar e *status* reprodutivo e hormonal, que são parte de uma complexa adaptação para permitir-lhes ajustar-se às condições ambientais (SZCZESNA et al., 2011).

Os requerimentos nutricionais de fêmeas ovinas jovens e adultas estão correlacionados ao peso e condição corporal, bem como ao estágio do ciclo e nível de produção reprodutiva, pois borregas estão em crescimento e ainda não alcançaram seu tamanho corporal de maturidade, necessitando de mais nutrientes em relação às ovelhas adultas (NRC, 2007; MUÑOZ et al., 2009). Variações no balanço de energia entre o *pool* de energia disponível e o *pool* de energia gasto, podem influenciar algum dos três níveis do eixo reprodutivo (hipotálamo, hipófise e gônadas), bem como ter impacto sobre os mecanismos de *feedback* regulatórios (BLACHE et al., 2008). Segundo Scaramuzzi et al. (2006), quando os requerimentos nutricionais do animal são maiores do que a ingestão de nutrientes, ele usará seus estoques de energia (glicogênio, triglicerídeos, proteína) para equilibrar o déficit, encontrando-se em balanço energético negativo. Já quando os requerimentos nutricionais são menores que a ingestão, ele armazenará o excesso de nutrientes (como glicogênio e triglicerídeos) e/ou dispersará este excesso como calor metabólico, estando em balanço energético positivo. Ovelhas mais jovens, imaturas, podem ter uma sensibilidade mais elevada ou reduzida habilidade para compensar a restrição ou o excesso nutricional, em um período de demanda específica (MUÑOZ et al., 2009).

Um problema comum no manejo reprodutivo é a carência de alimentos que coincide com os períodos secos, quando a forragem ou o crescimento das pastagens não ocorre ou é

muito pequeno. O uso de fontes alimentares para compensar a carência ou ausência de pastagens ricas em energia e proteína é particularmente importante (BLACHE et al., 2008), como ocorre nos meses de estação seca no Mato Grosso do Sul.

Em ovelhas, as populações foliculares são muito sensíveis ao estímulo nutricional, e a foliculogênese e a taxa de ovulação podem ser facilmente incrementadas por manipulações nutricionais. A manipulação da reprodução usando técnicas de manejo geral e de nutrição, para controlar a taxa de ovulação e a prolificidade, tem baixo custo e pode ser usada em todas as regiões geográficas (SCARAMUZZI et al., 2006; ZACHUT et al., 2008)

Os efeitos nutricionais sobre a taxa de ovulação são classificados em efeito agudo, no qual há ausência de uma variação detectável no peso corporal, efeito dinâmico ou de curto tempo, associado com peso corporal e condição corporal aumentando, por uma alimentação incrementada durante três a quatro semanas antes da monta, e efeito estático ou de longo tempo, em que há, principalmente, elevado peso e condição corporal, no qual ovelhas mais pesadas têm maior taxa de ovulação que ovelhas mais leves (COOP, 1966; SCARAMUZZI et al., 2006). No experimento de Meza-Herrera et al. (2007) houve predomínio do componente estático da nutrição das ovelhas sobre o *status* metabólico, demonstrando que este fator atua mais em nível local do que por modificar a secreção de hormônios periféricos. Em ovelhas alimentadas com dieta de cinco dias contendo alta energia e proteína (grão de tremoço) houve uma tendência a maior número de folículos ovarianos de todos os tamanhos, sem variação no peso corporal dos animais, sugerindo que as respostas gonadais à nutrição estão mais associadas aos sinais metabólicos e nutricionais específicos do que com peso ou condição corporal (SOMCHIT et al., 2007).

A influência do nível de ingestão alimentar sobre o modelo de dinâmica folicular e a taxa ovulatória de ovelhas é manifestada em um estágio mais tardio do ciclo estral, possivelmente através da composição do ambiente folicular (RHIND; McNEILLY, 1998; VINÖLES et al., 2005), o que pode refletir uma função integrada de gonadotrofinas, hormônios metabólicos e fatores de crescimento (RHIND; McNEILLY, 1998; SAMADI et al., 2013). As gonadotrofinas são, certamente, o principal fator regulador no desenvolvimento do folículo antral, mas também interagem com uma variedade de mecanismos de fatores de crescimento locais. Fatores extraovarianos, como as modificações nutricionalmente mediadas nos hormônios metabólicos, também afetam diretamente o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos (WEBB et al., 2004; ROSALES-NIETO et al., 2011; SAMADI et al., 2013). Dentre os fatores nutricionais responsáveis pelas variáveis reprodutivas, pode-se destacar o efeito da proteína (MEZA-HERRERA et al., 2007), do nível de vitamina A

(SHAW et al., 1995), da concentração de gordura (GHOREISHI et al., 2007; ESPINOZA et al., 2008; ZACHUT et al., 2008; GULLIVER et al., 2012), da condição corporal e da densidade energética da dieta (ZINN; PLASCENCIA, 1996; FORCADA, ABECIA, 2006; NRC, 2007), os quais têm efeitos aditivos ou supressivos sobre os níveis plasmáticos de substâncias determinantes do perfil metabólico dos animais. Alterações induzidas nutricionalmente em vários hormônios metabólicos podem estar correlacionadas com modificações na função ovariana, e os esteroides ovarianos podem modular a ação e a produção dos hormônios metabólicos, resultando em curvas de *feedback* interativas, positivas ou negativas (WEBB et al., 2004; SCARAMUZZI et al., 2006; BLACHE et al., 2008; SAMADI et al., 2013).

A função folicular é conhecida como sendo dependente, não somente dos sinais gonadotróficos mas, também, dos perfis de hormônios metabólicos e fatores de crescimento, os quais podem influenciar a esteroidogênese folicular ovariana e a diferenciação celular e, com isto, a capacidade ovulatória (SCARAMUZZI et al., 2006; VIÑOLES et al., 2009). Modificações na dieta causam uma rápida e imediata alteração em vários agentes metabólicos humorais, incluindo glicose, insulina, leptina e IGF-1, os quais, uma vez estimulados, levam à supressão da produção de estradiol (E_2) (VIÑOLES et al., 2005; SCARAMUZZI et al., 2006; ESPINOZA et al., 2008; VIÑOLES et al., 2009).

A adição de diferentes ingredientes na dieta resulta em distintos modelos de fermentação ruminal e produtos de digestão pós-ruminal. Ao atingirem o sangue, estes produtos podem ter efeitos marcantes sobre as concentrações sanguíneas de amônia, ureia e glicose, as quais, por sua vez, podem afetar as concentrações de hormônios e o balanço de eixos hormonais, refletindo-se na composição de fluidos foliculares e uterinos (ROCHE et al., 2011). Em ovelhas recebendo infusão intravenosa de glicose, a insulina e a leptina plasmáticas aumentam de forma aguda, ao contrário das fêmeas que receberam suplementação de tremoço duas vezes ao dia, por três ou cinco dias, em que os aumentos nestes hormônios foram mais lentos e graduais. Já o IGF-1 não variou, levando à suposição de que os efeitos nutricionais de curto prazo sobre o sistema IGF, no folículo, envolvam mecanismos ligados aos sistemas insulina-glicose e leptina (SCARAMUZZI et al., 2006).

Ao nível hipotalâmico, influências nutricionais sobre a reprodução são qualitativas na fertilidade, por definir se o animal ovula ou não. Contudo, uma vez que este limiar é alcançado e os ciclos ovarianos estejam ocorrendo, a regulação nutricional torna-se quantitativa, atuando no folículo, para determinar a taxa de ovulação (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008). O *status* do desenvolvimento folicular no momento das concentrações

máximas de glicose e hormônios metabólicos pode ser um dos fatores que determinam se a taxa de ovulação aumentará ou não (VIÑALES et al., 2005). Um certo nível de reservas de gordura pode ser requerido para o efeito da suplementação sobre a taxa de ovulação (BLACHE et al., 2006). No entanto, os resultados de Viñales et al. (2009) demonstraram que, ovelhas com diferenças de 0,6 ponto em seu escore de condição corporal, podem responder à suplementação de sete dias. Ovelhas subalimentadas por Sosa et al. (2010), com balanço energético negativo, evidenciaram um desvio desfavorável nos modelos de desenvolvimento final do folículo dominante quando comparados com os animais controle, demonstrando a influência nutricional sobre a foliculogênese.

Segundo Forcada e Abecia (2006), a modificação da estacionalidade reprodutiva em ovelhas que tenham um moderado nível de reservas de gordura usando a nutrição como única ferramenta de manejo, parece ser difícil. No entanto, citam ainda que, em ambiente tropical, é possível vencer o efeito regulatório do fotoperíodo sobre a estacionalidade reprodutiva em ovelhas que tenham um nível de reservas de gordura moderadamente alto. Neste sentido, Zinn e Plascencia (1996) registraram melhoria na eficiência alimentar, como resultado das maiores quantidades de energia metabolizável nos lipídios em relação aos carboidratos e proteína, com o que também corroboram Ghoreishi et al. (2007), utilizando dietas com gordura protegida comercial. Ovelhas em moderada condição corporal (2,0-2,75 numa escala de 0-5), mas alimentadas acima de seus requerimentos para manutenção (*flushing*), durante as semanas antes da ovulação e da cobertura, têm taxas de ovulação e parição mais altas que aquelas fêmeas em condição corporal similar, alimentadas com ração para manutenção do peso vivo (RHIND; MCNEILLY, 1998).

O peso corporal e o escore de condição corporal de ovelhas não foram alterados com a suplementação de curto prazo, mas aquelas fêmeas em baixa ou moderada condição corporal tiveram um aumento na taxa de ovulação após um período de suplementação de sete dias (VIÑALES et al., 2009). Para o controle da taxa ovulatória, as ações dos sinais nutricionais chegando ao folículo ovariano são mais importantes do que as modificações induzidas pela nutrição na atividade dos centros no cérebro que controlam a secreção de GnRH (MARTIN et al., 2004).

A subnutrição tem efeitos sobre as características foliculares, evidenciados nos estágios tardios do desenvolvimento folicular, pois ovelhas alimentadas para balanço energético negativo demonstraram um desvio nos modelos de desenvolvimento ao final da onda folicular, quando comparadas aos animais controle com balanço energético positivo (SOSA et al., 2009).

O mecanismo pelo qual incrementos nutricionais de curto tempo afetam o desenvolvimento folicular não envolve um aumento nas concentrações de FSH, mas pode envolver respostas às concentrações elevadas de insulina, glicose e leptina, atuando diretamente em nível ovariano, produzindo respostas agudas (VIÑALES et al., 2005; SCARAMUZZI et al., 2006; SAMADI et al., 2013). A supressão nutricional da secreção de E_2 leva a aumentos compensatórios indiretos na secreção de FSH, rápidos e transitórios, o que estimula a foliculogênese e restaura a homeostase *feedback* negativa (SCARAMUZZI et al., 2006). Szymanski et al. (2007) levantaram a hipótese de que, em ovelhas submetidas à restrição alimentar e, em seguida, alimentadas à vontade, os pulsos de LH são interrompidos pela restrição e reiniciados por modificações na utilização de combustíveis metabólicos oxidáveis e pela insulina. O *pool* de folículos disponíveis para a ação da glicose e dos hormônios metabólicos pode ter um papel-chave em estimular um aumento na taxa ovulatória (VIÑALES et al., 2005).

A insulina é um importante regulador da foliculogênese por causa de seu controle geral no fornecimento de glicose às células da teca e da granulosa, modulando a função folicular. Assim, um incremento no fornecimento de glicose, mediado pela insulina nas células foliculares, pode ser crítico para o crescimento de folículos e a prevenção da atresia, aumentando o *pool* de folículos ovulatórios (SCARAMUZZI et al., 2006; SOMCHIT et al., 2007; ZABULI et al., 2010). O aumento do E_2 ativa receptores de membrana nas células β pancreáticas, levando a uma liberação aguda de insulina, o que potencializa o transporte de glicose às células (ROPERO et al., 2008). Sendo a glicose a maior fonte de energia para o ovário, e os folículos tendo transportadores de glicose, um incremento no fornecimento de glicose e nos hormônios metabólicos aumentará a energia utilizável pelos folículos, bem como sua habilidade para crescer (MUÑOZ-GUTIÉRREZ et al., 2004; VIÑALES et al., 2009).

Na ovelha, o IGF-1 promove, principalmente, proliferação das células da granulosa de pequenos folículos (de 1-3 mm de diâmetro), por aumentar a expressão de receptores para FSH, enquanto em grandes folículos antrais (>5 mm de diâmetro), estimula a secreção de progesterona (P_4) pelas células da granulosa (SOUZA et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Ao estro, ovelhas estudadas por Sosa et al. (2006) manifestaram, tanto em animais recebendo a dieta normal quanto naqueles subnutridos, picos nas concentrações de glicose, insulina e IGF-1, o que poderia estar relacionado a uma resposta aguda às práticas de detecção de estro (estresse), desencadeantes de uma reduzida utilização de glicose, assim como a um aumento na sensibilidade pancreática ao E_2 . A elevação vista no IGF-1 poderia estar

relacionada ao coincidente pico de insulina, que levaria à maior secreção hepática de IGF-1. Aumentos nas concentrações de insulina melhoram a resposta dos folículos ovarianos às gonadotrofinas e garantem a produção de IGF-1 hepático (ROCHE et al., 2011).

No trabalho de Viñoles et al. (2005), um grupo de ovelhas recebeu o dobro da dieta de manutenção, entre os dias 9 e 14 de um ciclo sincronizado com duas injeções de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que resultou em aumento das concentrações plasmáticas de insulina do primeiro ao sexto dias de suplementação, em relação ao grupo controle, enquanto as concentrações de IGF-1 não apresentaram variações.

Os hormônios tireoideanos são considerados indicadores do *status* metabólico e nutricional dos animais, quando a ingestão de alimentos é marcadamente estacional, e isto torna-se o maior fator na modificação do modelo estacional dos perfis sanguíneos de hormônios tireoideanos, responsáveis pela regulação da taxa metabólica basal (FREAKE; OPPENHEIMER, 1995; TODINI, 2007). Amaral et al. (2009) encontraram concentrações de T_3 maiores na raça Santa Inês em relação às raças Texel e Ile de France, levando a uma maior ação termogênica para manter a homeotermia. No experimento de Rosales-Nieto et al. (2011), as concentrações de T_3 e T_4 foram semelhantes entre cabras alimentadas com 100% ou 150% de seus requerimentos nutricionais. Algumas condições ambientais podem causar grandes perdas de calor, requerendo suplementação da produção basal de calor como mecanismo adaptativo (FREAKE; OPPENHEIMER, 1995).

Os hormônios tireoideanos permitem o aumento na receptividade ao *feedback* negativo de E_2 , mas são, também, requeridos para ciclos estacionais independentes de esteroides na frequência de pulso de LH (ANDERSON et al., 2002; TODINI, 2007). O T_3 , cujas concentrações plasmáticas correlacionam-se, significativamente, com balanços de energia e nitrogênio, pode estimular, diretamente, a ingestão alimentar ao nível hipotalâmico (núcleo ventro-medial), enquanto a quantidade e a qualidade do alimento ingerido são o maior determinante das concentrações plasmáticas de hormônios tireoideanos (TODINI, 2007). A regulação da produção e do uso de energia pelas células é regulada pelo T_3 , através do controle sobre o consumo de oxigênio (FREAKE; OPPENHEIMER, 1995).

No entanto, os animais possuem habilidade para estocar energia e, também, criar mecanismos e estratégias para manejar seus depósitos de gordura de acordo com as modificações no suprimento e demanda energéticos ou com as condições ambientais (SZCZESNA et al., 2011).

O cortisol interfere negativamente com os momentos de expressão dos eventos da fase folicular em várias vias, em ambos os níveis, ovariano e neuroendócrino (BREEN; KARSCH,

2006). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal suprime as funções reprodutivas através da ativação de neurônios CRH (hormônio liberador de corticotrofina) no núcleo paraventricular hipotalâmico, inibindo a secreção pulsátil de LH, resultando em reduzida atividade gonadal (MOGI et al., 2008). Os estressores afetam a secreção de pico de GnRH/LH por interferirem com um mecanismo opioidérgico no hipotálamo (DOBSON et al., 2012). Por suprimir a secreção pulsátil de LH, o cortisol pode prevenir ou atrasar o pico pré-ovulatório de E₂ e, por fim, o pico pré-ovulatório de LH (BREEN; KARSCH, 2006). No entanto, os efeitos do cortisol sobre a ingestão alimentar e a função metabólica são dependentes de um *set-point* (nível exato para ação) metabólico do hipotálamo, determinado pela estação do ano, cujas variações inatas parecem influenciar a via pela qual as concentrações elevadas de cortisol alteram a ingestão e outras variáveis metabólicas (HENRY et al., 2010).

O cortisol também tem um importante papel na manutenção da função do corpo lúteo, por inibir diretamente a secreção uterina de PGF₂ α para suportar a implantação embrionária e o desenvolvimento inicial do embrião (DUONG et al., 2012). A sensibilidade do endométrio aos hormônios esteroides é crítica para prevenir a luteólise e para o reconhecimento materno da prenhez e sua manutenção e, desta forma, o destino do embrião (SOSA et al., 2006). O cortisol pode, ainda, suprimir a receptividade ovariana ao FSH e ao LH, levando a uma redução na secreção de E₂ e, conseqüentemente, interferindo com o pico pré-ovulatório de LH, além de uma possível ação de comprometimento da resposta neuroendócrina ao *feedback* positivo do E₂ (BREEN; KARSCH, 2006).

A produção metabólica sob uma suplementação nutricional de tempo curto (três a sete dias) difere muito daquela de um período de seis a oito semanas de suplementação. Da mesma forma, as conseqüências metabólicas da suplementação alimentar de animais em balanço energético negativo serão muito diferentes daquelas de animais em balanço energético positivo. Os efeitos sobre a foliculogênese ovariana também dependerão do estado metabólico do animal e da natureza da suplementação (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008). O ovário pode ser estimulado por uma variedade de dietas, tanto longas quanto naquelas que possam aumentar a quantidade de energia e/ou proteína por uns poucos dias próximos à ovulação (BLACHE et al., 2008)

Modificações nas concentrações de hormônios metabólicos no sangue são importantes sinais que informam o *status* nutricional de mamíferos (MEZA-HERRERA et al., 2007; MEZA-HERRERA et al., 2008; ROSALES-NIETO et al., 2011). Metabólitos e hormônios metabólicos podem ser absorvidos do sangue e provocar respostas no útero e na glândula mamária com um maior grau de independência do controle central (MARTIN et al., 2004).

Altos níveis de fornecimento de energia na dieta podem reduzir a performance reprodutiva, por aumentar a taxa de *clearance* (depuração plasmática) da P_4 e do E_2 (MEZA-HERRERA et al., 2007; RENQUIST et al., 2008).

A nutrição tem um marcante impacto sobre o *clearance* dos hormônios esteroides, o que pode refletir-se nas suas concentrações plasmáticas. A ingestão alimentar elevada está associada à maior taxa de *clearance* metabólico dos esteroides, devido ao fluxo sanguíneo aumentado no fígado e intestino (MEZA-HERRERA et al., 2007). Diferenças na taxa de *clearance*, mais do que nos níveis de secreção, podem explicar a aparente relação inversa entre nutrição e concentrações periféricas de esteroides (FORCADA; ABECIA, 2006; RENQUIST et al., 2008). Variações na função hepática podem, também, afetar a taxa de *clearance* metabólico dos hormônios esteroides por diminuir a produção ou *clearance* das proteínas de união a estes hormônios (RENQUIST et al., 2008).

Parece que o efeito do estímulo nutricional de curto prazo, em termos de indução de aumentos na taxa de ovulação, é mais fraco do que o estímulo nutricional de longo prazo em pequenos ruminantes. É largamente conhecido que o *flushing* de longo prazo (3-4 semanas), considerado tradicional, produz resultados de aumento na taxa ovulatória (COOP, 1966). Um certo período de *status* metabólico aumentado, estimulando a emergência e crescimento de folículos ovulatórios é requerido em uma estratégia para promover a performance ovariana por estímulo nutricional de curto prazo (ZABULI et al., 2010).

Uma alta ingestão de alimentos ou um alto conteúdo de gordura corporal podem estar associados com reduzida atividade estrogênica no plasma, a qual leva a menor sensibilidade hipotalâmica ao *feedback* negativo do E_2 (FORCADA; ABECIA, 2006). Porém, a efetividade da manipulação nutricional sobre a taxa ovulatória nem sempre é consistente, o que sugere que um aumento nesta taxa dependa do *status* folicular no começo do tratamento nutricional, entre outros fatores (VIÑALES et al., 2005). Concentrações elevadas de E_2 são fundamentais, pois o aumento do E_2 ativa receptores de membrana nas células β pancreáticas, levando a uma liberação aguda de insulina (ROPERO et al., 2008), fundamental para a dominância do maior folículo, culminando com ovulação.

O E_2 também tem ações metabólicas, pois diminui o complexo lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol e aumenta o complexo lipoproteína de alta densidade (HDL)-colesterol plasmáticos, sendo o decréscimo no LDL-colesterol resultado do incremento da expressão hepática de receptor-LDL, o que aumenta o *clearance* da LDL plasmática e a secreção de colesterol na bile (FAULDS et al., 2012). Além disso, os estrógenos podem regular a quantidade de tecido adiposo branco em machos e fêmeas, uma vez que seu receptor

α está envolvido no metabolismo de glicose mediado pela insulina no tecido adiposo e músculo esquelético (ROPERO et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- AMARAL, D.F. et al. Efeito da suplementação alimentar nas respostas fisiológicas, hormonais e sanguíneas de ovelhas Santa Inês, Ile de France e Texel. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.31, p.49-58, 2009.
- ANDERSON, G.M. et al. Thyroid hormones mediate steroid-independent seasonal changes in luteinizing hormone pulsatility in the ewe. *Biology of Reproduction*, v.66, p.701-706, 2002.
- BLACHE, D.; MALONEY, S.K.; REVELL, D.K. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Animal Feeding Science and Technology*, v.147, p.140-157, 2008.
- BLACHE, D.; ZHANG, S.; MARTIN, G.B. Dynamic and integrative aspects of the regulate of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.46, p.379-390, 2006.
- BREEN, K.M.; KARSCH, F.J. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.27, p.233-245, 2006.
- COOP, L.E. Effect of flushing on reproductive performance of ewes. *Journal of Agricultural Science*, v.67, p.305-323, 1966.
- DOBSON, H. et al. Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science*, v.130, p.135-140, 2012.
- DUONG, H.T. et al. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: and *in vivo* study. *Journal of Reproduction and Development*, v.58, p.223-230, 2012.
- ESPINOZA, J.L. et al. Efecto de la suplementación de grasas sobre las concentraciones séricas de progesterona, insulina, somatotropina y algunos metabolitos de los lípidos en ovejas Pelibuey. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.40, p.135-140, 2008.
- FAULDS, M.H. et al. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *Journal of Endocrinology*, v.212, p.3-12, 2012.
- FORCADA, F.; ABECIA, J.A. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reproduction, Nutrition and Development*, v.46, p.355-365, 2006.
- FREAKE, H.C.; OPPENHEIMER, J.H. Thermogenesis and thyroid function. *Annual Review of Nutrition*, v.15, p.263-291, 1995.
- GHOREISHI, S.M. et al. Effect of a calcium soap of fatty acids on reproductive characteristics and lactation performance of fat-tailed sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.10, p.2389-2395, 2007.
- GULLIVER, C.E. et al. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Animal Reproduction Science*, v.131, p.9-22, 2012.
- HENRY, B.A. et al. Altered “set-point” of the hypothalamus determines effects of cortisol on

- food intake, adiposity, and metabolic substrates in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, v.38, p.46-56, 2010.
- MARTIN, G.B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.491-501, 2004.
- MEZA-HERRERA, C.A. et al. Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.461-465, 2007.
- MEZA-HERRERA, C.A. et al. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Animal Reproduction Science*, v.106, p.412-420, 2008.
- MOGI, K. et al. Central administration of Neuropeptide B, but not prolactin-releasing peptide, stimulates cortisol secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.54, p.138-141, 2008.
- MUÑOZ, C. et al. Effect of plane of nutrition of 1- and 2-year-old ewes in early and mid-pregnancy on ewe reproduction and offspring performance up to weaning. *Animal*, v.3, n.5, p.657-669, 2009.
- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M. et al. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction*, v.128, p.747-756, 2004.
- NRC, National Research Council. *Nutrients requirements of small ruminants*. Washington, DC: National Academies Press, 2007. 362p.
- RENQUIST, B.J. et al. Dietary restriction reduces the rate of estradiol clearance in sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, v.86, p.1124-1131, 2008.
- RHIND, S.M.; McNEILLY, A.S. Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, v.52, p.131-138, 1998.
- ROCHE, J.R. et al. Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? *Animal Production Science*, v.51, p.1045-1066, 2011.
- ROPERO, A.B. et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*, v.73, p.874-879, 2008.
- ROSALES-NIETO, C.A. et al. Nutritional and metabolic modulation of the male effect on the resumption of ovulatory activity in goats. *Animal Production Science*, v.51, p.115-122, 2011.
- SAMADI, F. et al. Interrelationships of nutrition, metabolic hormones and resumption of ovulation in multiparous suckled beef cows on subtropical pastures. *Animal Reproduction Science*, v.137, p.137-144, 2013.
- SCARAMUZZI, R.J.; MARTIN, G.B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, Suppl.2, v.43, p.129-136, 2008.
- SCARAMUZZI, R.J. et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction, Nutrition and Development*,

- v.46, p.1-16, 2006.
- SGORLON, S. et al. Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. *Small Ruminant Research*, v.74, p.123-129, 2008.
- SHAW, D.W., FARIM, P.W., WASHBURN, R. Effect of retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle. *Theriogenology*, v.44, p.51-58, 1995.
- SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; HURK, R. van den. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, v.71, p.1193-1208, 2009.
- SOMCHIT, A. et al. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology*, v.68, p.1037-1046, 2007.
- SOSA, C. et al. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.18, p.447-458, 2006.
- SOSA, C. et al. Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, v.21, p.869-881, 2009.
- SOSA, C. et al. Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.1033-1038, 2010.
- SOUZA, M.I.L.; RAMÍREZ, G.F.B.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F. Papel del factor de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, v.6, p.149-159, 2007.
- SZCZESNA, M. et al. Interactive *in vitro* effect of prolactin, growth hormone and season on leptin secretion by ovine adipose tissue. *Small Ruminant Research*, v.100, p.177-183, 2011.
- SZYMANSKI, L.A. et al. Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinizing hormone secretion in ewes. *Journal of Neuroendocrinology*, v.19, p.449-460, 2007.
- TODINI, L. Thyroid hormones in small ruminants: effects of endogenous, environmental and nutritional factors. *Animal*, v.1, p.997-1008, 2007.
- VILLA, N.A. et al. Medidas corporales y concentración sérica y folicular de lípidos y glucosa en vacas Brahman fértiles y subfértiles. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1198-1204, 2009.
- VIÑALES, C. et al. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*, v.129, p.299-309, 2005.
- VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; MARTIN, G.B. Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, v.113, p.82-92, 2009.
- WEBB, R. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v.82, E-Suppl., E63-E74, 2004.

- ZACHUT, M. et al. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction*, v.135, p.683-692, 2008.
- ZABULI, J. et al. Intermittent nutritional stimulus by short-term treatment of high-energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cycling goats. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.288-293, 2010.
- ZINN, R.A.; PLASCENCIA, A. Effects of forage level on the comparative feeding value of supplemental fat in growing-finishing diets for feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, v.74, p.1194-1201, 1996.

Respostas de insulina, IGF-1, T₃, T₄, cortisol e estradiol em ovelhas submetidas a *flushing* de curto e longo prazo

Responses of insulin, IGF-1, T₃, T₄, cortisol and oestradiol in sheep under the flushing of short and long time

Heliton Franco Pereira¹, Maria Inês Lenz Souza²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, Av. Senador Filinto Muller, 2443 - Campo Grande – MS, e-mail: heliton@veterinario.med.br

²Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMS, maria.souza@ufms.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o tempo de suplementação com *flushing* no início da estação reprodutiva, sobre os perfis de hormônios metabólicos, estradiol, maior folículo e peso corporal de fêmeas ovinas destinadas à reprodução. Utilizaram-se 30 ovelhas Santa Inês adultas, cíclicas, com escore corporal de 2,5 a 3,0, distribuídas em dois grupos de 15 animais. No grupo 30 dias (G₃₀), as ovelhas foram mantidas em pastagem de grama batatais (*Paspalum notatum flueggé*) e suplementadas com silagem de milho uma vez ao dia, durante 30 dias pré-cobertura. No grupo sete dias (G₇), permaneceram em pastagem de grama batatais, sem suplementação, até nove dias antes da cobertura, quando passaram a receber uma suplementação de concentrado com alto teor energético (milho moído), uma vez ao dia, por uma semana. O sangue foi colhido ao início e final da suplementação e no dia do estro, para quantificação sérica de triiodotironina (T₃), tiroxina (T₄), IGF-1, insulina, cortisol e estradiol. O tamanho do maior folículo em cada ovário foi medido por ultrassonografia no dia do estro. Após análise estatística verificou-se que os perfis hormonais mostraram-se similares nos dois grupos, compatíveis com equilíbrio metabólico, nutricional e reprodutivo, tendo concentrações maiores (exceto para T₃) no início do *flushing* no G₃₀ e no estro no G₇. O G₃₀ ganhou peso ao longo do *flushing*. As concentrações séricas de estradiol e o tamanho do maior folículo nos ovários não variaram entre as dietas. Em conclusão, o uso de *flushing* no início da estação reprodutiva, seja com silagem de milho em longo prazo ou com milho moído em curto prazo, apresenta resultados semelhantes sobre os perfis de hormônios metabólicos de T₃, T₄, IGF-1, insulina e cortisol, representando uma alternativa viável para a preparação das ovelhas para a reprodução, uma vez que os ovários das mesmas continham folículos igualmente estrogênicos.

Palavras-chave: dietas, hormônios, ovinos, folículo ovariano, reprodução

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the supplementation period at early reproductive season, on profile of metabolic hormones, estradiol, large follicle and body weight to ewes breeding. Thirty adult cyclic Santa Inês with body condition scores around 2,5

and 3 were used, the sheep was separated into groups of 15 animals. At the thirty days group (G₃₀), the ewes were kept grazing on batatais (*Paspalum notatum* Flueggé) grass and supplemented with corn silage once a day, during trinta days before the breeding period. The seven days group (G₇), the animals were grazed on batatais grass, without supplementation until nine days before breeding, from this time these sheep were supplemented with high energy diet (ground corn), once a day, during one week. Blood was collected at the beginning and at the end of the supplementation, and at the estrus day, to quantify serum triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), IGF-1, insulin, cortisol and estradiol. The size of large follicle in each ovary it was measured by ultrasound on day estrous. The statistical analysis was verified that hormonal profile remained in the physiological limits at the both groups, consistent with metabolic, nutritional and reproductive balance and G₃₀ gained weight during the period of *flushing*. Oestradiol serum concentrations follicle diameter in the ovaries were not different between diets. In conclusion, the use of flushing at the beginning of breeding season either with corn silage a long time or with ground corn a short time, it shows similar results on profiles of metabolic hormones T₃, T₄, IGF-1, insulin and cortisol representing a viable alternative for the preparation of sheep for reproduction, once a time the ovaries of her also contained follicles equally oestrogen.

Keywords: diet, hormones, ovine, ovarian follicle, breeding

Introdução

O *flushing* é uma técnica de manejo eficiente e de baixo custo, que, ao possibilitar maior taxa de ovulação e, conseqüentemente, melhor eficiência reprodutiva, otimiza a produção de cordeiros. Dobson et al. (2012) citam que Clark, em 1934, já trabalhava em experimentos com utilização de *flushing* no manejo reprodutivo ovino. É largamente conhecido que o *flushing* de longo prazo (3-4 semanas), considerado tradicional, produz resultados de aumento na taxa ovulatória (Coop, 1966). É importante o conhecimento dos efeitos provocados por dietas de *flushing*, nos animais criados a campo, sobre os perfis hormonais, dinâmica folicular e índices de produtividade, visando o estabelecimento de técnicas simples de manejo que possam ser difundidas aos produtores e prontamente utilizadas por eles, trazendo retorno econômico na forma de mais cordeiros produzidos em relação à área e ao número de fêmeas utilizadas.

Os nutrientes da dieta promovem a expressão das vias metabólicas que habilitam os animais a alcançarem seu potencial genético para produção e reprodução (Martin et al., 2004; Blache et al., 2008). Em ruminantes a nutrição é uma das entradas exógenas de sinais que afetam a função reprodutiva em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Scaramuzzi et al., 2006; Meza-Herrera et al., 2007; Blache et al., 2008; Samadi et al., 2013).

A ligação entre os sistemas metabólico-nutricional e reprodutivo envolve um ou mais hormônios metabólicos, fluxo de nutrientes e homeostase nutricional (Scaramuzzi et al., 2006).

A nutrição pode afetar vários aspectos do processo reprodutivo, como a puberdade, produção de gametas, crescimento placentário, lactação, programação fetal e produção de colostro em relação à sobrevivência dos filhotes neonatos (Martin et al., 2004; Scaramuzzi et al., 2006; Somchit et al., 2007). As influências exercidas pela nutrição na reprodução afetam eventos como a foliculogênese e esteroidogênese (Villa et al., 2009).

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de dois períodos de suplementação com *flushing* de curto e longo prazos, sobre as concentrações séricas dos hormônios metabólicos (insulina, fator de crescimento semelhante à insulina -1 - IGF-1, triiodotironina - T₃, tiroxina - T₄ e cortisol), e de estradiol (E₂), tamanho do maior folículo ovariano e peso corporal de fêmeas ovinas destinadas à reprodução.

Material e Métodos

O experimento foi certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFMS sob protocolo nº 302/2011. Utilizaram-se 30 ovelhas Santa Inês adultas e cíclicas, com idades entre dois e quatro anos, multíparas, reprodutivamente aptas, criadas em um rebanho no município de Fátima do Sul-MS, latitude 22°22'27" Sul e longitude 54°30'50" Oeste. As fêmeas apresentavam escore corporal entre 2,5 a 3,0 (Pugh, 2004), obtidos pela manutenção das mesmas em pastagem natural, sem suplementação, por, no mínimo, 30 dias. O experimento foi realizado no período de transição de final de primavera e verão, nos meses de novembro de 2010 até janeiro de 2011, durante os quais os animais receberam os tratamentos, de acordo com o manejo experimental.

As ovelhas foram pesadas, seu escore condição corporal (ECC) avaliado em escala 0 – 5 (Pugh, 2004) e o sangue colhido, em tubos com vácuo, para posterior obtenção de soro. Distribuíram-se ao acaso as fêmeas em dois grupos (G₃₀ e G₇) de 15 animais cada, submetidos a duas dietas de *flushing*, formuladas segundo NRC (2007), para fornecer 100% das exigências nutricionais dos animais juntamente com a pastagem, sendo a suplementação de 2,7% do peso corporal das ovelhas. No Grupo 30 dias (G₃₀; n=15) as ovelhas foram mantidas em pastagem natural de grama batatais (*Paspalum notatum* Flueggé), sem alternância de piquete, com igual disponibilidade de forragem, e receberam um suplemento de silagem de milho uma vez ao dia, durante 30 dias pré-cobertura (considerando-se como tratamento convencional, controle, por já ter seu efeito comprovado), sendo pesadas e tendo o sangue colhido ao início e término do tratamento nutricional e no dia do estro, sempre no período da

manhã. No Grupo sete dias (G₇; n=15), as ovelhas permaneceram em pastagem natural de grama batatais, sem suplementação, até nove dias antes da cobertura, quando passaram a receber, por uma semana, uma suplementação com ração de alto teor energético (milho moído PB=9% e NDT=80%), uma vez ao dia, sendo pesadas e tendo o sangue colhido também na manhã dos dias de início e término do tratamento nutricional e no dia do estro.

Realizou-se, durante o período de *flushing*, a sincronização de estro destas fêmeas, com dispositivos intravaginais de progesterona (CIDR[®]), mantidos por seis dias e aplicação de 350 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon[®]) no momento da retirada (coincidente com o término do *flushing* do G₇). Foi realizada a monta controlada das fêmeas por carneiros comprovadamente aptos, seguindo-se o manejo convencional da propriedade.

No dia seguinte à retirada dos dispositivos, submetem-se as fêmeas à ultrassonografia transretal (equipamento SIUI - CTS-5500V e transdutor linear retal prostático U7150 de 5 a 10 MHz), para avaliação ovariana, com ênfase no maior folículo, mantendo-se os animais em estação, colhendo-se sangue para quantificação de estradiol.

As amostras de soro foram quantificadas em suas concentrações hormonais de triiodotironina (T₃; Coat-A-Count Triiodotironina, fase sólida, Diagnostic Products Corporation), tiroxina (T₄; Coat-A-Count Tiroxina, fase sólida, Diagnostic Products Corporation), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1; IGF-1 – DSL Diagnostic Systems Laboratories), insulina (Coat-A-Count Insulina, fase sólida, Diagnostic Products Corporation), cortisol (Coat-A-Count Cortisol, fase sólida, Diagnostic Products Corporation), e estradiol (Estradiol – DSL[®], fase sólida), por radioimunoensaio, no Laboratório de Endocrinologia da FMVZ/UNESP – Botucatu, SP.

O efeito do grupo experimental e do momento de análise, bem como da interação entre estes fatores, em relação aos níveis séricos de T₃, T₄, IGF-1, insulina, cortisol e E₂, assim como do peso corporal e do ECC, foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de medidas repetitivas, no tempo (início, término e dia do estro), seguida pelo pós-teste de Tukey. O mesmo teste foi usado para a avaliação do efeito do grupo experimental e do ovário, bem como da interação entre estes, em relação ao tamanho dos folículos. Já a comparação entre os grupos, em relação ao nível sérico de estradiol, foi realizada por meio do teste t-student. Utilizou-se o “Software” SigmaStat, versão 3.5, considerando-se um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

As médias de peso corporal não diferiram entre os grupos experimentais, início e término do *flushing* (p>0,05; Tabela 1).

Tabela 1. Médias (\pm erro padrão da média) do peso corporal (kg) e do escore de condição corporal (ECC; 0-5) de ovelhas Santa Inês, suplementadas com *flushing* de trinta dias e de sete dias, no início e término do *flushing*, Fátima do Sul, MS.

Variável	<i>Flushing</i>			
	30 dias		7 dias	
	Início	Término	Início	Término
Peso	44,03 \pm 0,37 ^{Ba}	46,97 \pm 0,42 ^{Aa}	44,70 \pm 0,30 ^{Aa}	44,79 \pm 0,33 ^{Aa}
ECC	3,14 \pm 0,02 ^{Ba}	3,56 \pm 0,02 ^{Aa}	2,97 \pm 0,02 ^{Aa}	2,97 \pm 0,02 ^{Ab}

* letras maiúsculas distintas indicam diferença entre momentos no grupo; letras minúsculas distintas indicam diferenças entre grupos em cada momento.

No entanto, no G₃₀, o peso foi maior ($p < 0,001$) ao final do *flushing* em relação ao peso inicial ($p < 0,05$), o que não foi verificado no G₇ ($p > 0,05$). Somchit et al. (2007) também não verificaram variação no peso corporal de ovelhas alimentadas com dieta de cinco dias contendo alta energia e proteína (grão de tremoço). De forma similar ao G₃₀, ovelhas alimentadas por Lazarin et al. (2012) com milho ou farelo de soja, para obtenção de dietas com alto teor proteico, durante 28 dias pré-ovulação e em mais um ciclo estral, apresentaram maior peso corporal e ganho de peso diário em relação aos animais recebendo dieta de manutenção, ainda que a condição corporal não tenha variado.

O ganho de peso variou entre os grupos ($p < 0,0001$), com 2,93 kg para o G₃₀ e 0,08 kg para o G₇, havendo uma alta correlação positiva entre peso inicial e peso final ($p < 0,0001$; $r = 0,97$). Este ganho de peso era esperado, uma vez que o G₃₀ recebeu uma suplementação alimentar por tempo mais longo, com um efeito dinâmico da nutrição destinado a melhorar a taxa ovulatória durante o período reprodutivo, associado com peso corporal em aumento progressivo (Scaramuzzi et al., 2006; Blache et al., 2008; Sosa et al., 2009). Além disso, este ganho de peso será importante na futura gestação destas fêmeas, para responder positivamente

à demanda energética aumentada pelo desenvolvimento embrionário/fetal, placenta e lactação. Já o G₇ encontrava-se sob o efeito agudo, sem ganho de peso (Coop, 1966; Scaramuzzi et al., 2006). A produção metabólica de uma suplementação nutricional de tempo curto (três a sete dias) difere muito daquela de um período de seis a oito semanas de suplementação (Scaramuzzi e Martin, 2008), fato verificado na ausência de diferença de peso entre os animais do G₇ em relação ao ganho de peso daqueles do G₃₀. É importante considerar, também, que animais estacionais exibem variações anuais de peso corporal, conteúdo de gordura, ingestão alimentar e *status* reprodutivo e hormonal, que são parte de uma adaptação para permitir-lhes ajustar-se às condições ambientais (Szczesna et al., 2011), e que esta característica é mantida, mesmo em animais sob suplementação. Isto pode interagir com algum dos três níveis do eixo reprodutivo (hipotálamo, hipófise e gônadas), bem como ter impacto sobre os mecanismos de *feedback* regulatórios (Blache et al., 2008).

Já o ECC apresentou efeito de grupo ($p=0,002$) e momento ($p<0,001$), em que o G₃₀ teve maior ECC que o G₇ ao final do *flushing* ($p<0,05$; Tabela 1), acompanhando o ganho de peso corporal, sem variações no momento inicial ($p>0,05$). O estado nutricional dos animais, refletido em sua condição corporal, é determinante para manter uma adequada função reprodutiva (Villa et al., 2009).

De forma semelhante, no experimento de Viñoles et al. (2009), o peso corporal e o ECC não foram alterados com a suplementação em curto prazo (sete dias), mas os autores afirmaram que ovelhas com diferenças de 0,6 ponto em seu ECC, podem responder com um aumento da prolificidade à suplementação de sete dias. Meza-Herrera et al. (2008) citaram que o nível nutricional, em longo prazo, determina tanto o peso como a condição corporal, como verificado no presente experimento, enquanto em curto prazo, está relacionado ao nível aumentado de nutrientes estimulando diretamente as características reprodutivas.

Como a reprodução tem uma demanda energética muito elevada, com variações ao longo do ciclo reprodutivo, o balanço energético é um forte regulador da função reprodutiva (Blache et al., 2008). Portanto, é fundamental a manutenção ou o ganho de peso corporal e/ou de ECC, como visto nos animais dos dois grupos deste experimento, pois o manejo reprodutivo deve ser adequado para garantir um suprimento alimentar da forragem que preencha os requerimentos nutricionais dos animais (Roche et al., 2011). No entanto, em regiões de clima tropical, às vezes é difícil encontrar os requerimentos de nutrição adequados dos rebanhos, porque a quantidade e a qualidade das forragens variam com a estação, as quais podem ser escassas na estação seca (Blache et al., 2008), o que reforça a importância do *flushing*.

O *status* metabólico do animal (balanço energético positivo ou negativo) e as

alterações concomitantes no apetite e na divisão de nutrientes entre os tecidos são regulados por uma série de complexas interações entre as concentrações sanguíneas de hormônios metabólicos (IGF-1, hormônio do crescimento, insulina e leptina) e os vários fluxos de nutrientes no sangue (Scaramuzzi et al., 2006; Blache et al., 2008). Modificações nas concentrações de hormônios metabólicos no sangue são importantes sinais que informam o *status* nutricional de mamíferos (Meza-Herrera et al., 2007; 2008; Rosales-Nieto et al., 2011).

Na Tabela 2 estão apresentadas as médias \pm erro padrão dos hormônios metabólicos avaliados, nos três distintos momentos, sejam eles início e término do *flushing* e dia do estro, para os grupos estudados.

O intervalo de variação fisiológico das respostas endócrinas às diferentes condições é muito grande, e valores de referência são difíceis de obter (Todini, 2007).

Tabela 2. Médias (\pm erro padrão da média) da concentração dos hormônios T₃, T₄, IGF-1, insulina e cortisol, em ovelhas Santa Inês, suplementadas com *flushing* de trinta dias e de sete dias, nos dias de início e término do *flushing* e no dia do estro, Fátima do Sul, MS.

Variável	Flushing					
	30 dias de suplementação			7 dias de suplementação		
	Início	Término	Dia do estro	Início	Término	Dia do estro
T ₃ -triiodotironina (ng/dL)	78,40 \pm 1,27 ^{Aa}	121,65 \pm 8,18 ^{Aa}	79,07 \pm 1,58 ^{Aa}	89,26 \pm 2,34 ^{Aa}	74,98 \pm 8,65 ^{Aa}	88,49 \pm 1,82 ^{Aa}
T ₄ -tiroxina (mg/dL)	2,01 \pm 0,05 ^{Ba}	4,09 \pm 0,10 ^{Aa}	2,62 \pm 0,04 ^{Ba}	2,50 \pm 0,06 ^{Ba}	3,51 \pm 0,11 ^{Aa}	2,98 \pm 0,11 ^{Ba}
IGF-1 (ng/mL)	193,33 \pm 4,81 ^{Aa}	160,62 \pm 2,40 ^{ABa}	156,92 \pm 2,07 ^{Ba}	160,13 \pm 3,24 ^{Ba}	161,59 \pm 4,29 ^{Ba}	204,31 \pm 4,66 ^{Aa}
Insulina (mIU/mL)	3,14 \pm 0,13 ^{Aa}	1,81 \pm 0,08 ^{Bb}	2,33 \pm 0,09 ^{ABa}	1,36 \pm 0,04 ^{Bb}	3,45 \pm 0,14 ^{Aa}	1,27 \pm 0,05 ^{Bb}
Cortisol (mg/dL)	1,47 \pm 0,05 ^{Aa}	1,21 \pm 0,05 ^{ABa}	0,84 \pm 0,04 ^{Ba}	0,61 \pm 0,03 ^{Bb}	0,72 \pm 0,05 ^{ABa}	1,19 \pm 0,05 ^{Aa}

* letras maiúsculas distintas indicam diferença entre momentos no grupo; letras minúsculas distintas indicam diferenças entre grupos em cada momento.

Os hormônios tireoideanos são considerados indicadores do *status* metabólico e nutricional dos animais (Todini, 2007; Amaral et al., 2009). O T₃ não apresentou variação significativa entre grupos ($p>0,05$) e momentos avaliados ($p>0,05$), indicando um equilíbrio metabólico, pois a quantidade e a qualidade do alimento ingerido são o maior determinante das concentrações plasmáticas de hormônios tireoideanos, e o T₃ pode estimular, diretamente, a ingestão alimentar em nível hipotalâmico (Todini, 2007).

Já as concentrações séricas de T₄ apresentaram efeito de momento ($p<0,001$), sem diferença entre os grupos ($p>0,05$), demonstrando um comportamento similar dos grupos nos distintos momentos, sendo maiores no final em relação ao início do *flushing* ($p<0,05$) e ao dia do estro ($p<0,05$), evidenciando uma resposta da tireoide à suplementação alimentar. O estado físico dos animais tem um importante papel nas concentrações séricas de T₃ e T₄ (Todini, 2007; Rosales-Nieto et al., 2011), assim como o clima, em função do efeito calorigênico, proporcionado pelo aumento do consumo de oxigênio celular e da taxa metabólica basal, refletindo o aumento do metabolismo celular (Amaral et al., 2009). Como este experimento realizou-se nos meses de final de primavera (outubro a dezembro) e início de verão (dezembro a janeiro), este último efeito não poderia ser evidenciado, exceto durante o dia do estro, quando o animal tem elevação de sua temperatura corporal pelo aumento do metabolismo basal proporcionado pelo estímulo dos hormônios esteroides sobre os hormônios tireoideanos (Amaral et al., 2009; Rosales-Nieto et al., 2011). Quando a ingestão de alimentos é marcadamente estacional, isto torna-se o maior fator na modificação do modelo estacional das concentrações séricas dos hormônios tireoideanos (Todini, 2007).

Aparentemente, na função reprodutiva, o sistema IGF prepara o folículo dominante selecionado para a utilização decrescente de FSH e aumentada de LH, sendo um iniciador do desvio folicular e do mecanismo de seleção (Souza et al., 2007; Silva et al., 2009), estimulando a proliferação folicular e a esteroidogênese (Scaramuzzi et al., 2006). O IGF-1 não apresentou efeito de grupo ($p>0,05$) ou de momento ($p>0,05$), mas interação entre grupo e momento ($p<0,001$), ou seja, os grupos comportaram-se de forma distinta entre os momentos. Os animais do grupo G₇ apresentaram concentrações séricas mais elevadas de IGF-1 no dia do estro ($p<0,05$) em relação ao G₃₀. No G₃₀ houve maior concentração sérica de IGF-1 no dia de início do *flushing* em relação aos outros dois momentos ($p<0,05$). Por outro lado, as concentrações séricas de IGF-1 no G₇ foram maiores no dia do estro em comparação aos dias de início ($p<0,05$) e término ($p<0,05$) do *flushing*, que não diferiram entre si ($p>0,05$). Seguindo este perfil do G₇, Nonaka et al. (2003) verificaram que as concentrações plasmáticas de IGF-1 aumentam em cabras durante o estro. De forma distinta aos resultados obtidos, ovelhas em maior ECC, como no G₃₀, avaliadas por Meza-Herrera et al. (2007),

apresentaram concentrações séricas de IGF-1 mais elevadas. Por outro lado, sabe-se que a bioutilização do IGF, mais do que suas concentrações circulantes, varia dramaticamente durante o crescimento ou a atresia de folículos ovarianos (Silva et al., 2009).

Os resultados de Sosa et al. (2006) demonstram que, ao estro, tanto animais recebendo a dieta normal quanto aqueles subnutridos, tiveram picos nas concentrações de glicose, insulina e IGF-1, o que pode estar relacionado a uma resposta aguda às práticas de detecção de estro (causadores de estresse), desencadeantes por reduzida utilização de glicose, assim como a um aumento na sensibilidade pancreática ao E_2 . Os animais do G_{30} , como receberam suplementação durante um período mais longo e tiveram, portanto, um manejo mais intensificado, podem ter sofrido adaptação metabólica com ajustes nas respostas de estresse, que tornaram-se menos intensas, ao contrário do G_7 , cujas fêmeas tiveram menos tempo para esta habituação. O aumento no IGF-1 pode estar relacionado ao coincidente pico de insulina, que levaria a uma maior secreção hepática de IGF-1.

Aumentos nos níveis sanguíneos de glicose e insulina regulam a disponibilidade de glicose ao nível folicular e a foliculogênese em ovelhas (Zabuli et al., 2010; Samadi et al., 2013), e um aumento no fornecimento de glicose mediado pela insulina para as células foliculares pode ser crítico para o crescimento de folículos e a prevenção da atresia, o que aumenta o *pool* de folículos ovulatórios (Scaramuzzi et al., 2006; Zabuli et al., 2010). A insulina apresentou efeito de momento ($p < 0,05$), mas sem efeito de grupo ($p > 0,05$). Para o grupo G_{30} as concentrações séricas de insulina foram mais elevadas ao início do *flushing* ($p < 0,05$), refletindo uma resposta aguda à suplementação, e no dia do estro ($p < 0,05$), em relação ao término do *flushing*, demonstrando a maior necessidade de insulina para fornecer glicose aos tecidos durante as respostas de estro, por aumento da taxa de metabolismo basal e para o crescimento folicular final. Já no G_7 , a insulina foi maior no momento final do *flushing* ($p < 0,05$), refletindo apenas uma diferença no tempo de metabolismo, com uma resposta mais aguda neste hormônio, levando ao pico 24 horas antes do G_{30} . Elevações nas concentrações de insulina aumentam a receptividade dos folículos ovarianos às gonadotrofinas e garantem a produção de IGF-1 hepático (Roche et al., 2011), fato verificado de forma mais marcante no G_7 . Webb et al. (2004) citam que as concentrações circulantes de insulina exibem ritmo circadiano e variações ao longo do ciclo estral, com elevações no período periovulatório, provavelmente mediadas pelo E_2 , o que pode ter sido refletido nos níveis verificados no G_{30} e adiantados no G_7 pela alteração metabólica da dieta de curto prazo. Os resultados de Somchit et al. (2007) mostraram que a suplementação de ovelhas com tremçoço (ração com alta energia) por cinco dias também aumentou as concentrações plasmáticas e intrafoliculares de insulina e glicose, substâncias requeridas para a mediação da foliculogênese nutricionalmente

estimulada.

No presente experimento, o G₇, que recebeu ração com alta energia, demonstrou um aumento nos níveis de insulina ao final do *flushing*, uma vez que quase a totalidade dos carboidratos incorporados à dieta dos ruminantes é fermentada pela microflora ruminal e convertida em ácidos graxos voláteis, os quais são substratos utilizados como precursores de glicose (Zabaleta et al., 2012).

O cortisol não variou entre grupos ($p>0,05$) ou entre momentos ($p>0,05$), mas apresentou interação significativa entre grupos e momentos ($p=0,001$), indicando um comportamento diferente em cada grupo dentro dos momentos. Neste sentido, dentro do G₃₀, o cortisol foi mais elevado no início do *flushing* do que no dia do estro ($p<0,05$), refletindo apenas o estresse de manejo inicial dos animais, sem variações nos outros períodos, enquanto no G₇ o comportamento foi inverso, ou seja, cortisol mais alto no estro do que no dia de início do *flushing* ($p<0,05$), como reflexo, talvez, de um estresse crônico não compensado dentro dos sete dias de dieta, ainda sem adaptação às manipulações e/ou de uma resposta metabólica ao aumento da disponibilidade de energia pelo fornecimento de milho. A susceptibilidade às ações do cortisol difere entre indivíduos, tanto que o cortisol pode, na função reprodutiva, prevenir o pico de LH em algumas ovelhas e atrasar ou reduzir o tamanho deste pico em outras (Pierce et al., 2009). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal frente às situações estressantes desencadeia mudanças de conduta e fisiológicas que melhoram a adaptabilidade do organismo e aumentam suas oportunidades de sobrevivência (Álvarez, 2008). Os efeitos do cortisol sobre a ingestão alimentar e a função metabólica são dependentes de uma liberação metabólica programada (*set-point*) do hipotálamo, determinada pela estação do ano, que parecem influenciar a via pela qual as concentrações aumentadas de cortisol alteram a ingestão de outras variáveis metabólicas, como fontes de energia (Henry et al., 2010), também ligado à disponibilidade de alimento, que foi alta no período experimental, por ser a estação chuvosa. Além disso, a maior concentração de cortisol no G₇ pode estar relacionada ao aumento agudo no fornecimento alimentar, em função do tempo curto, indicando um aumento da taxa metabólica

O estradiol é essencial para a foliculogênese normal além do estágio antral e para manutenção do fenótipo feminino em células somáticas ovarianas (Findlay et al., 2009). O E₂ sérico medido no dia do estro apresentou médias±erro padrão de 30,93±0,40 pg/mL no G₃₀ e 30,34±0,20 pg/mL no G₇, sem diferença entre elas ($p>0,05$). Concentrações elevadas de E₂ são fundamentais, pois o aumento do E₂ ativa receptores de membrana nas células β pancreáticas, levando a uma liberação aguda de insulina (Ropero et al., 2008), como visto nos dois grupos, fundamental para a dominância do maior folículo, culminando com ovulação.

Nos resultados de Somchit et al. (2007), verificaram variação nas concentrações de FSH e E₂ em resposta à estimulação nutricional de curto prazo com dieta rica em energia e proteína, e os autores referem-se a que isto pode levar à modificações nas inter-relações na dinâmica de *feedback* entre estes hormônios. No presente experimento não se verificou variação no E₂ entre os grupos, mas os níveis obtidos foram elevados (Uribe-Velásquez et al., 2008), em função do momento de avaliação, dia do estro.

Neste mesmo momento, avaliou-se o tamanho do maior folículo em cada ovário, sendo o direito de 3,64±0,05 mm no G₃₀ e 3,40±0,04 mm no G₇ (p>0,05). No ovário esquerdo, o maior folículo do G₃₀ teve 3,67±0,07 mm, semelhante ao G₇, com 3,14±0,05 mm (p>0,05). McNeilly et al. (1987) afirmam que, se grandes folículos estrogênicos crescem e tornam-se mais estrogênicos, não há influência da condição corporal sobre a capacidade esteroidogênica destes folículos, como verificado nos dois grupos de *flushing* testados, em que, independentemente da condição corporal, houve folículos estrogênicos nos dois ovários, refletido nas concentrações séricas deste esteroide.

De forma semelhante aos resultados obtidos com o tamanho do maior folículo, sem diferenças entre os grupos experimentais, o diâmetro médio do folículo ovulatório, avaliado por Lazarin et al. (2012), não diferiu entre ovelhas recebendo *flushing* ou dieta de manutenção. Conforme Zabuli et al. (2010), parece que o efeito do estímulo nutricional de curto prazo, em termos de indução de aumentos na taxa de ovulação é mais fraco do que o estímulo nutricional de longo prazo em pequenos ruminantes, o que não foi verificado no presente experimento, em que as respostas endócrinas e reprodutivas foram similares entre os dois prazos de suplementação. A resposta ovulatória é estreitamente relacionada à quantidade de pastagem verde disponível, em função de melhora na qualidade do alimento, e o modelo de alimentação também pode ser importante (King et al., 2010).

Para Lazarin et al. (2012), o uso de *flushing* com farelo de soja ou milho pode ser uma estratégia para aumentar o número de ovulações em ovelhas Santa Inês, como evidenciado também no presente experimento com o milho moído ou a silagem de milho. Já King et al. (2010) referem-se a que a alimentação melhorada de curto prazo para ovelhas sincronizadas, em pastagem verde, é um método para aumentar a taxa de ovulação, sem risco de gestações trigemelares. Nos dois grupos estudados, os animais recebiam a suplementação mas eram mantidos, ao longo do restante do período, em pastagem verde. No entanto, um fator que não pode ser esquecido é a condição corporal dos animais, que foi considerada boa (2,5-3,0), em função do suprimento de alimentos das pastagens na época de chuvas, e que pode ter interferido negativamente nos resultados do *flushing*, uma vez que os animais aproveitariam menos este suplemento como estímulo ovulatório em relação aos animais em menor ECC. Ao

realizar-se experimentos a campo, tem-se susceptibilidade a estes fatores ambientais e climáticos, às vezes indesejáveis, e que acabam interferindo com os resultados.

Conclusões

O uso de *flushing* no início da estação reprodutiva, seja com silagem de milho em longo prazo ou com milho moído em curto prazo, apresenta resultados semelhantes sobre os perfis de hormônios metabólicos de T₃, T₄, IGF-1, insulina e cortisol, representando uma alternativa viável para a preparação das ovelhas para a reprodução, uma vez que os ovários das mesmas continham folículos igualmente estrogênicos.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado.

Referências Bibliográficas

- ÁLVAREZ, L. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. **Archivos de Zootecnia**, v.57, p.39-59, 2008.
- AMARAL, D.F.; BARBOSA, O.R.; GASPARINO, E. et al. Efeito da suplementação alimentar nas respostas fisiológicas, hormonais e sanguíneas de ovelhas Santa Inês, Ile de France e Texel. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.31, p.49-58, 2009.
- BLACHE, D.; MALONEY, S.K.; REVELL, D.K. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. **Animal Feeding Science and Technology**, v.147, p.140-157, 2008.
- COOP, L.E. Effect of flushing on reproductive performance of ewes. **Journal of Agricultural Science**, v.67, p.305-323, 1966.
- DOBSON, H.; FERGANI, C.; ROUTLY, J.E. et al. Effects of stress on reproduction in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.135-140, 2012.
- FINDLAY, J.K.; KERR, J.B.; BRITT, K. et al. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p.16-19, 2009.
- HENRY, B.A.; BLACHE, D.; DUNSHEA, F.R. et al. Altered “set-point” of the hypothalamus determines effects of cortisol on food intake, adiposity, and metabolic substrates in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.38, p.46-56, 2010.
- KING, B.J., ROBERTSON, S.M., WILKINS, J.F. et al. Short-term grazing of lucerne and chicory increases ovulation rate in synchronized Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, v.121, n.3-4, p.242-248, 2010.
- LAZARIN, G.B.; ALVES, N.G.; PEREZ, J.R.O. et al. Plasma urea nitrogen and progesterone concentrations and follicular dynamics in ewes fed proteins of different degradability. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.1638-1647, 2012.

- MARTIN, G.B.; RODGER, J.; BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.491-501, 2004.
- McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A.; RHIND, S.M. Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v.115, p.75-83, 1987.
- MEZA-HERRERA, C.A.; ROSS, T.; HALLFORD, D. et al. Effects of body condition and protein supplementation on LH secretion and luteal function in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.461-465, 2007.
- MEZA-HERRERA, C.A.; HALLFORD, D.M.; ORTIZ, J.A. et al. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.412-420, 2008.
- NONAKA, S.; HASHIZUME, T.; HORIUCHI, M. et al. Origin of plasma insulin-like growth factor-I (IGF-1) during estrus in goats. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p.253-258, 2003.
- NRC, National Research Council. **Nutrients requirements of small ruminants**. Washington, DC: National Academies Press, 2007. 362p.
- PIERCE, B.N.; CLARKE, I.J.; TURNER, A.I. et al. Cortisol disrupts the ability of estradiol-17 β to induce the LH surge in ovariectomized ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v.36, p.202-208, 2009.
- PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1. ed. São Paulo, SP: Roca, 2004. 513p.
- ROCHE, J.R.; BURKE, C.R.; MEIER, S. et al. Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? **Animal Production Science**, v.51, p.1045-1066, 2011.
- ROPERO, A.B.; ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I. et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**, v.73, p.874-879, 2008.
- ROSALES-NIETO, C.A.; GAMEZ-VAZQUEZ, H.G.; GUDINO-REYES, J. et al. Nutritional and metabolic modulation of the male effect on the resumption of ovulatory activity in goats. **Animal Production Science**, v.51, p.115-122, 2011.
- SAMADI, F.; PHILLIPS, N.J.; BLACHE, D. et al. Interrelationships of nutrition, metabolic hormones and resumption of ovulation in multiparous suckled beef cows on subtropical pastures. *Animal Reproduction Science*, v.137, p.137-144, 2013.
- SCARAMUZZI, R.J.; MARTIN, G.B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl.2, v.43, p.129-136, 2008.
- SCARAMUZZI, R.J.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A. et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.46, p.1-16, 2006.

- SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; HURK, R. van den. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v.71, p.1193-1208, 2009.
- SOMCHIT, A.; CAMPBELL, B.K.; KHALID, M. et al. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. **Theriogenology**, v.68, p.1037-1046, 2007.
- SOSA, C.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F. et al. Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.447-458, 2006.
- SOSA, C.; ABECIA, J.A.; CARRIQUIRY, M. et al. Effect of undernutrition on the uterine environment during maternal recognition of pregnancy in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.869-881, 2009.
- SOUZA, M.I.L.; RAMÍREZ, G.F.B.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F. Papel del factor de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. **Biosalud**, v.6, p.149-159, 2007.
- SZCZESNA, M.; ZIEBA, D.A.; KLOCEK-GORKA, B. et al. Interactive *in vitro* effect of prolactin, growth hormone and season on leptin secretion by ovine adipose tissue. **Small Ruminant Research**, v.100, p.177-183, 2011.
- TODINI, L. Thyroid hormones in small ruminants: effects of endogenous, environmental and nutritional factors. **Animal**, v.1, p.997-1008, 2007.
- URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M.I.L. Efeitos da progesterona exógena sobre o desenvolvimento folicular em ovelhas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v.60, n.1, p.58-65, 2008.
- VILLA, N.A.; PULGARÍN, E.F.; TABARES, P.A. et al. Medidas corporales y concentración sérica y folicular de lípidos y glucosa en vacas Brahman fértiles y subfértiles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1198-1204, 2009.
- VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; MARTIN, G.B. Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.82-92, 2009.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, E-Suppl., E63-E74, 2004.
- ZABALETA, J.; PÉREZ, M.L.; RIERA, M. et al. Concentración de glucosa y triglicéridos en el suero sanguíneo de cabras de la raza Canaria durante el período de transición. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.22, n.3, p.225-230, 2012.
- ZABULI, J.; TANAKA, T.; LU, W. et al. Intermittent nutritional stimulus by short-term treatment of high-energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cycling goats. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.288-293, 2010.