

# O NÍVEL DE COLESTEROL INFLUENCIA A QUANTIDADE DE FOLÍCULOS NA PUNÇÃO FOLICULAR DE VACAS DE CORTE

PFEIFER, Luiz Francisco M.<sup>1</sup>; PIVATO, Ivo<sup>3</sup>; RUMPF, Rodolfo<sup>4</sup>; DIONELLO, Nelson José L.<sup>1</sup>; SCHNEIDER, Augusto<sup>2</sup>; GOULART, Maikel<sup>2</sup>; VARELLA, Antônio Sérgio Júnior<sup>2</sup>; CORRÊA, Marcio Nunes<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia - Depto de Zootecnia - UFPel

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária, Depto de Clínicas Veterinária, UFPel

<sup>3</sup> CIDASC - Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrário de Santa Catarina

<sup>4</sup> EMBRAPA - Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia

## 1. INTRODUÇÃO

O controle do crescimento folicular em animais monovulatórios, como os ruminantes, depende de uma série de fatores de crescimento folicular que atuam tanto em nível ovariano quanto em nível hipofisário (Hsu *et al.*, 1987). Além destes fatores endógenos, uma série de fatores ambientais, principalmente a nutrição, pode influenciar o desenvolvimento folicular e a qualidade ovocitária e, conseqüentemente, a fertilidade (Garnsworthy & Webb, 1999). Desta forma, a dieta a que um animal está submetido influencia a atividade ovariana através da ação, em vários níveis, no eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano (Webb *et al.*, 2004). Existem evidências de que o perfil metabólico de cada animal pode influenciar diretamente a qualidade ovocitária, assim como o desenvolvimento folicular, já que vários fatores de crescimento folicular estão relacionados com o nível alimentar destes animais (Armstrong *et al.*, 2001, Gutiérrez *et al.*, 1997, Leroy *et al.*, 2004). Neste âmbito, o estudo de alguns marcadores metabólicos se torna interessante, bem como a interação destes com hormônios da reprodução e função ovariana. Baseado em tais considerações alguns hormônios, como o colesterol, que possui influência direta na regulação ovariana, podem estar afetando o desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, a fertilidade dos animais. O colesterol pode ser usado como marcador metabólico, para avaliar esta interação metabolismo-reprodução, já que atua como precursor de hormônios esteróides (Grummer & Carroll, 1988; Grummer & Carroll, 1991). Estando também relacionado com a regulação do eixo hipotálamo-hipofisário e, conseqüentemente, a foliculogênese, pois o aumento do nível sérico de colesterol, aumenta o nível de inibina e estradiol, que atuam diretamente nos mecanismos de divergência folicular (Kastelic, 2004).

Este estudo teve por objetivo avaliar o número de folículos aptos à punção e qualidade de ovócitos de vacas de corte com diferentes níveis de colesterol sérico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste experimento foram utilizadas 5 vacas mestiças (*bos taurus x bos indicus*), com condição corporal (CC) 3, em regime de pastagem (*Brachiaria brizanta*) recebendo suplementação mineral (sal proteinado – EMBRAPA Cerrados). Todas as vacas receberam um CIDR<sup>®</sup> (dispositivo liberador de progesterona) (1,9 g de progesterona/dispositivo) por 8 dias. Dois dias antes da retirada dos dispositivos, todas as vacas receberam

0,150 mg de D-cloprostenol (Prostaglandina Tortuga<sup>®</sup>, im), um análogo de prostaglandina, para descartar a presença de um corpo lúteo desde o início do experimento evitando a influência de progesterona endógena nos tratamentos.

No dia da retirada dos CIDR<sup>®</sup>s todas vacas foram submetidas à punção folicular (PF), para promover a padronização do crescimento folicular. Após esta 1<sup>o</sup> PF as vacas foram submetidas à PF a cada 4 dias totalizando 6 sessões. Após a primeira PF, as vacas receberam um CIDR<sup>®</sup> reutilizado. O CIDR<sup>®</sup> foi trocado a cada 8 dias, coincidindo com o momento da aplicação de D-cloprostenol.

O método de aspiração folicular utilizado no experimento foi o descrito por Petyim *et al.* (2003). Foram puncionados todos os folículos que possuíam diâmetro acima de 3 mm.

A classificação dos ovócitos foi feita através da avaliação dos complexo-cumulus-ovócitos (CCOs) coletados, sendo as categorias I e II consideradas como de boa qualidade e as categorias III e IV como de má qualidade (Leibfried & First, 1979).

As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em todas as sessões de PF. A progesterona foi determinada pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida com I<sup>123</sup> (Coat-A-Count<sup>®</sup>, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) e os níveis de colesterol foram medidos através de reações colorimétricas (LABTEST<sup>®</sup>) com a utilização de espectrofotômetro de luz visível FEMTO 435<sup>®</sup> a partir da amostra coletada da 1<sup>o</sup> PF.

Após a avaliação do colesterol, os animais divididos em 2 grupos, G1 (n=3): animais que apresentaram colesterol dentro dos padrões fisiológicos ( $\leq 50$  mg/dL) e G2 (n=2): animais que apresentaram colesterol acima dos níveis fisiológicos ( $> 50$  mg/dL) (González *et al.*, 2000).

A comparação das médias para as variáveis dependentes foi feita pelo método dos Quadrados Médios Mínimos (*Least Square Means*). Todas as análises foram feitas através do procedimento GLM (*General Linear Models*) do SAS<sup>®</sup> (1991).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 329 folículos foram puncionados durante as 6 sessões de PF realizadas no experimento. A taxa de recuperação ovocitária foi de 62,31%. Foi recuperado um total de 205 ovócitos.

Em relação ao número de folículos puncionados, o G1 apresentou menor ( $p < 0,01$ ) número folículos por punção/vaca do que o G2, 9,66 e 12,6, respectivamente. No entanto, estes grupos não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) na qualidade e quantidade de ovócitos coletados. Foi registrado no G1 uma média de 5,5 ovócitos por punção, sendo 2,3 ovócitos de qualidade I e II, enquanto que no G2 foram recuperados 7,5 ovócitos por vaca, sendo 2,4 ovócitos de qualidade I e II. A média de folículos/vaca/PF, registrado neste trabalho, concorda com os resultados registrados por Petyim *et al.* (2003) que registraram uma média de folículos de  $6,6 \pm 2,9$ /punção/vaca.

Tabela 1 – Resultados das punções foliculares de acordo com o nível de colesterol

Grupo	Folículos/punção/vaca	Ovócitos/punção/vaca	
		Total	Qualidade I e II
G1 ( $\leq 50$ mg/dL)	9,66 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>
G2 ( $> 50$ mg/dL)	12,6 <sup>b</sup>	7,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ )

Letras iguais na mesma coluna não indicam diferença estatística ( $p > 0,05$ )

O nível de progesterona registrado neste experimento foi de 1,58 ng/mL, e como previsto, não houve diferença entre os animais ( $p > 0,05$ ), sendo compatíveis com os níveis séricos registrados no período luteal recente (Sartori *et al.*, 2004).

O aumento no número de folículos registrados em animais com colesterol acima de 50 mg/dL, indicam que pode haver influência dos níveis de colesterol na foliculogênese. Da mesma forma, Armstrong *et al.* (2001), apesar de não terem avaliado o colesterol de animais alimentados com dietas altamente energéticas, verificaram que um aumento nos níveis de IGF-I e de insulina, contribuem para o aumento da taxa de crescimento folicular. Este fato pode estar relacionado com o aumento do número de folículos registrado nos animais com maior concentração de colesterol sérico verificado neste experimento.

Como o colesterol é responsável pela síntese de hormônios esteróides (Grummer & Carroll, 1991; 1988), os animais que apresentaram maiores níveis de colesterol podem ter apresentado maior esteroidogênese em nível folicular (Kronfed *et al.*, 1980). Segundo Leroy *et al.* (2004), um aumento do nível sérico de colesterol determina aumento do nível de colesterol intrafolicular, desta forma o nível de inibina e estradiol, principais esteróides sintetizados no folículo, pode estar elevado nos animais do G2, que apresentaram nível de colesterol acima do fisiológico. Este aumento do nível de esteróides pode estar aumentando o bloqueio (*feed-back* negativo) no eixo hipotálamo-hipofisário (Kastelic, 2004), desta forma, impedindo a atuação dos mecanismos de divergência folicular para seleção do folículo dominante e, conseqüentemente, de atresia folicular. Este fato também pode estar associado ao intervalo de 4 dias entre as PFs o que reduz bastante o nível de atresia, pois não permite que ocorra dominância folicular neste curto espaço de tempo (Gibbons *et al.*, 1994).

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados, verificou-se que vacas com níveis de colesterol superior à 50 mg/dL apresentaram um maior número de folículos aptos à punção.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, D. G., MCEVOY T. G., BAXTER G., ROBINSON J. J., HOGG C. O., WOAD K. J., WEBB, R., SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction*, New York, v. 64, p. 1624–32, 2001.

BOLAND M. P., LONERGAN P., O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, Los Altos, v. 55, p. 1323–40, 2001.

GARNSWORTHY, P. C., WEBB, R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. In: *RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION*. 1999. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, U.K. 1999. p. 39–58.

GIBBONS, J. R., BEAL, W. E., KRISHER, R. L., FABER, E. G., PEARSON, R. E., GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, los Altos, v. 42, p.405-419, 1994.

GONZALEZ, F. H. D., Barcelos, J., Patino, H. O., Ribeiro, L. A. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, 2000.

GRUMMER, R. R., CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: Importance to ovarian function. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 66, p. 3160-3173, 1988.

GRUMMER, R. R., CARROLL, D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 69, p. 3838-3852, 1991.

HSU, C. J., HOLMES, S. D., HAMMOND, J. M. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, New York, v. 147, p. 242–247, 1987.

KASTELIC, J. P. Folliculogenesis in cattle. *Anais do 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*. 2004.

KRONFELD, D. S., DONOGHUE, S., NAYLOR, J. M., JOHNSON, K., BRADLEY, C. A. Metabolic effects of feeding protected tallow to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 63, p. 545–552, 1980.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 48, p. 76-86, 1979.

LEROY, J. L. M. R., VANHOLDER, T., DELANGHE, J. R., OPSOMER, G., VAN SOOM, A., BOLS, P.E.J., DEWULF, J., DE KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, Los Altos, v. 62, p. 1131–1143, 2004.

PETYIM, S., BAGE, R., HALLAP, T., BERGQVIST, A. S., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effects on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, Los Altos, v. 60, p. 175-188, 2003.

SARTORI, R., HAUGHIAN, J. M., SHAVER, R. D., ROSA, G. J. M., WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 87, p. 905-920, 2004.

SAS®. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1991.

WEBB, R., GARNSWORTHY, P. C., GONG, J. G., ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 82, p. E63–E74, 2004.