

## Perfil Hormonal de Progesterona durante o Ciclo Estral em Novilhas Nelore Confinadas com Diferentes Ondas de Crescimento Folicular

Luciene Lomas Santiago<sup>1</sup>, Ciro Alexandre Alves Torres<sup>2</sup>, Luiz Fernando Uribe-Velásquez<sup>3</sup>, Paulo Roberto Cecon<sup>4</sup>, Eduardo Terra Nogueira<sup>5</sup>

**RESUMO** - Efetuaram-se coletas diárias de sangue, de 16 novilhas Nelore confinadas, para análise de progesterona plasmática pelo método de radioimunoensaio (RIA). Os dias analisados para progesterona foram o dia zero (estro) e a cada três dias até o dia -1 e o dia zero. Os animais foram divididos em dois grupos: 1) com ciclo estral de 21 dias aproximadamente (novilhas que apresentaram duas e três ondas de crescimento folicular) e 2) com ciclo estral superior a 25 dias (novilhas com quatro ondas de crescimento folicular). As concentrações médias de progesterona plasmática dos animais durante o ciclo estral diferiram entre os dois grupos, sendo superiores (4,27 ng/mL) para os ciclos de maior duração. A concentração média de progesterona no ciclo de aproximadamente 21 dias foi de 2,54 ng/mL. Os resultados sugerem que as novilhas que apresentam maior duração do ciclo estral necessitam de tempo adicional para que seus folículos cheguem ao estágio pré-ovulatório, havendo, dessa maneira, prolongamento e aumento da secreção de progesterona.

Palavras-chave: Nelore, novilha, ondas foliculares, progesterona, radioimunoensaio

## Plasma Progesterone Level during the Estrous Cycle in Nelore Heifers Confined with Two, Three and Four Waves of Follicular Growth

**ABSTRACT** - Blood were collected daily from 16 Nelore heifers confined, for radioimmunoassay (RIA). analyses of progesterone The plasma progesterone assay were at day zero (estrus) and at each three days until the -1 and the day zero. again The animals were divided in two groups: 1) with regular estrous cycle of 21 days (heifers with two and three follicular growth waves) and 2) with prolonged estrous cycle, greater than 25 days (heifers with four follicular growth waves). The mean plasma progesterone level from the animals during the estrous cycle differed between the two groups, being greater (4,27 ng/mL) for the extended cycles. (above 25 days; 4,27 ng/mL) than for the regular estrous cycle (21 days; 2,54 ng/mL). Results suggest that those heifers which showed an extended estrous cycles, needs an additional time for the follicles to reach the pre-ovulatory stadium, resulting in prolonged and increased progesterone secretion.

Key Words: follicular waves, heifer, Nelore, progesterone, radioimmunoassay

### Introdução

O gado Zebu (*Bos taurus indicus*) é predominante no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais, sendo representado em sua maioria pela raça Nelore. Os zebuínos, geralmente, têm menor potencial para produção de leite e carne e menor fertilidade que o gado europeu, havendo escassez de informação sobre a fisiologia reprodutiva dos mesmos (FIGUEIREDO et al., 1997). Menor corpo lúteo e menores concentrações periféricas de progesterona têm sido relatados em *Bos taurus indicus* (Randel, 1984, citado por CAVALIERI et al., 1997).

O número de ondas em um ciclo é determinado

pelo momento da regressão luteal, sendo que a progesterona apresenta efeitos inibitórios sobre o crescimento folicular. Animais que exibem duas ondas de desenvolvimento folicular apresentam o ciclo estral e a fase luteal mais curtos (FORTUNE et al., 1991). Adicionalmente, a persistência do corpo lúteo (CL) aumenta com o número de folículos dominantes por intervalo, como ocorreu com a duração da secreção de progesterona durante a fase luteal, segundo ADAMS et al. (1992) e SUNDERLAND et al. (1994).

Na fase luteal, quando a progesterona varia de 5 a 8 ng/mL, a frequência dos pulsos de LH é baixa e o recrutamento de folículos desenvolve e regride subsequencialmente. Quando concentrações perifé-

<sup>1</sup> Doutoranda em Zootecnia - Departamento de Zootecnia - UFV. CEP: 36571-000. E.mail: luciene@alunos.ufv.br

<sup>2</sup> Professor Titular - Departamento de Zootecnia - UFV. CEP: 36571-000. E.mail: ctorres@mail.ufv.br

<sup>3</sup> Pós-doutorando em - UNESP - Botucatu. R. Darwin de Amaral Viegas, 63, apto 3. CEP: 18607-680. Botucatu - SP. E.mail: lfuribe@zaz.com.br

<sup>4</sup> Professor Adjunto IV - Departamento de Informática - UFV. CEP: 36571-000. E.mail: cecon@dpi.ufv.br

<sup>5</sup> Doutorando em Zootecnia - Departamento de Zootecnia - UFV. CEP: 36571-000. E.mail: nogueira@alunos.ufv.br

ricas de progesterona são mantidas em 1 a 2 ng/mL, a frequência dos pulsos aumenta e o maior folículo é mantido. O restabelecimento da progesterona ao valor normal na fase luteal reduz a frequência dos pulsos de LH e resulta em regressão do maior folículo (SPICER e ECHTERNKAMP, 1986; GUILHERME, 1988; DUCHENS et al., 1994; MILVAE et al., 1996; TAFT et al., 1996; OLIVEIRA, 1997).

Segundo FIGUEIREDO et al. (1997), o número de ondas foliculares não influencia a concentração plasmática de progesterona em vacas e novilhas Nelore, apresentando duas ou três ondas de crescimento folicular. RHODES et al. (1995) não encontraram diferenças nas concentrações diárias de progesterona plasmática em novilhas Brahman, quando ciclos estrais com diferentes números de folículos dominantes foram comparados. Entretanto, de acordo com FORTUNE et al. (1991), mudanças sutis no perfil endócrino podem mudar dramaticamente o tempo das ondas foliculares e prolongar o período de dominância, levando ao prolongamento da fase luteal e desenvolvimento adicional de ondas foliculares em novilhas.

O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil plasmático de progesterona durante um ciclo estral, em novilhas Nelore confinadas que apresentaram diferentes números de ondas foliculares.

### Material e Métodos

Vinte novilhas Nelore de rebanho comercial, criadas a pasto, com idade média de 2,4 anos (2,0-2,9 anos) e peso médio de 335 kg (300-370 kg), foram selecionadas para o estudo de dinâmica folicular, no período de março a agosto de 1998. Os critérios de seleção utilizados foram a presença de corpo lúteo palpável e o diagnóstico de gestação negativo.

O experimento foi conduzido no galpão experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, sendo as novilhas instaladas em quatro currais cimentados, com fornecimento de feno de *coastcross* (quantidade média consumida = 10 kg/animal) e ração com 18% de proteína bruta (quantidade média consumida = 2,5 kg/animal) nos cochos, com água e suplemento mineral ad libitum.

Os animais foram vermifugados com ivermectina, vacinados contra leptospirose na primeira semana e submetidos, durante um mês, ao manejo de contenção em tronco, para adaptação, por serem criados a campo e pouco manejados. Durante esse período,

além da alimentação, os animais foram observados duas vezes ao dia durante meia hora, às 6h30 e 18h30, para detecção do estro. Junto às novilhas ficou um rufião, para facilitar a manifestação e a detecção do estro. Quatro animais não manifestaram sinais de estro e foram excluídos do experimento.

A ultra-sonografia ovariana diária para acompanhamento da dinâmica folicular iniciou a partir do segundo estro observado. Os exames ultra-sonográficos foram realizados pela via transretal, durante um ciclo estral normal, utilizando o aparelho ALOKA, modelo SSD-500, acoplado a um transdutor linear de 5 MHz. A ultra-sonografia do ciclo estral foi acompanhada da ovulação no segundo estro observado até a ovulação seguinte. As estruturas puderam ser visualizadas via monitor de tela, no qual foi possível estabelecer as delimitações para mensuração das mesmas. Registraram-se o diâmetro dos quatro maiores folículos ( $\geq 3$ mm), o número de folículos pequenos ( $< 3$ mm) em cada ovário, a presença e localização do corpo lúteo, o dia do ciclo e a data de observação do sinal de estro.

Durante a realização do exame retal com auxílio do ultra-som nos animais, iniciou-se a coleta diária de sangue, para posterior análise de progesterona, a qual foi feita antes de se realizar o exame ultra-sonográfico em cada animal. Considerou-se o dia do estro como dia zero para a determinação do perfil de progesterona.

O sangue foi coletado da veia ou artéria coccígea com tubos de vacutainer contendo heparina, mantido em gelo até o término da coleta de todos os animais. Após quatro horas, realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos para separação do plasma. As amostras foram colocadas em tubetes plásticos devidamente identificados com o número da novilha e o dia do ciclo e do mês em que o animal se encontrava e armazenadas em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o transporte para a análise, quando foi acondicionado em isopor com gelo. As análises realizaram-se na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu, nos laboratórios de Reprodução e Radiologia, pelo método de radioimunoensaio (RIA), com a utilização de kits comerciais (DPC Medlab), em fase sólida. Analisaram-se 158 amostras de progesterona (P4); com "pool" (10% do total de amostras formaram o "pool" e destes retirou-se uma alíquota para análise), em duplicata, realizado no início e no final da análise, e a cada dez amostras fez-se nova duplicata. Nos dias em que os valores estavam muito baixos (estro), repetiu-se a análise de

P4 para confirmação dos valores obtidos. Os dias escolhidos para ser analisados constavam o dia zero (estro) e a cada três dias até o estro do ciclo seguinte. O número de amostras de cada novilha variou conforme o tamanho do ciclo estral do animal.

O coeficiente de variação intra-ensaio para a progesterona baixa foi de 13,85% e para progesterona alta, de 4,05%. Não houve coeficiente de variação interensaio, sendo todas as amostras analisadas em um único ensaio.

Os animais foram divididos em dois grupos para a análise estatística, um formado por aqueles com ciclo estral de 21 dias aproximadamente (com duas ou três ondas de crescimento folicular; n = 12) e outro com os que apresentaram ciclo estral superior a 25 dias (animais com quatro ondas de crescimento folicular; n = 4).

Na análise estatística utilizou-se o programa SAEG 7.0, aplicando análises de variância e regressão, a fim de se determinar a concentração plasmática de progesterona, tendo como fonte de variação os períodos de coleta.

## Resultados e Discussão

A concentração média de progesterona durante o ciclo estral diferiu entre os animais dos dois grupos, sendo superior (4,27 ng/mL) para os ciclos de maior duração. A concentração média de progesterona no ciclo de aproximadamente 21 dias foi de 2,54 ng/mL.

Analisando-se as Figuras 1 e 2, constata-se diferença nas concentrações médias de progesterona plasmática, quando ciclos estrais com diferentes números de folículos dominantes (2, 3 e 4 folículos dominantes), em ciclos com 21 e mais de 25 dias, foram comparados, não havendo diferença para ciclos com duas e três ondas, sendo que ambas diferiram do ciclo com quatro ondas de crescimento folicular. O mesmo foi observado por RHODES et al. (1995) e FIGUEIREDO et al. (1997) com relação aos ciclos com duas e três ondas. Apesar destes autores terem observado ciclos com quatro folículos dominantes, não se mensurou a concentração plasmática de progesterona destes animais.

Por não ter havido, provavelmente, secreção de prostaglandina endometrial, principalmente, para lisar o corpo lúteo, segundo SUNDERLAND et al. (1994), nem liberação do pico de LH para que ocorresse a ovulação, houve secreção prolongada de progesterona pelo corpo lúteo, levando a um prolongamento no

ciclo estral dos animais com quatro ondas de crescimento folicular. O folículo dominante em estágio pré-ovulatório, sob baixa frequência dos pulsos de LH, entra em atresia (MILVAE et al., 1996; TAFT et al., 1996; OLIVEIRA, 1997) e um tempo adicional é requerido para que nova onda folicular possa emergir e um folículo dominante cresça até o estágio pré-ovulatório (OLIVEIRA, 1997), aumentando assim o número de dias e de ondas foliculares por ciclo estral e a secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Estes resultados diferem dos observados por RHODES et al. (1995), que não verificaram prolongamento do ciclo estral naqueles animais em que quatro folículos dominantes se desenvolveram.

As equações das Figuras 1 e 2 subestimam o valor de P4 no dia zero.

A concentração da progesterona plasmática foi baixa nos ciclos estrais normais e longos (respectivamente, -0,28 e -0,19 ng/mL), durante o estro. Isto se deveu, provavelmente, à secreção de PGF2a pelas células endometriais, que causou a luteólise, levando à queda nas concentrações de progesterona, que começou se elevar a partir do terceiro dia. No ciclo normal (21 dias), a progesterona atingiu valores máximos de 4,42 ng/mL, no dia 12, enquanto no ciclo longo (acima de 25 dias) a concentração máxima foi de 7,19 ng/mL, no dia 18 após o estro. Os baixos níveis de progesterona foram devidos, provavelmente, à secreção de estrógeno pelo folículo pré-ovulatório, o qual age nas células endometriais, estimulando o aumento de receptores para a ocitocina,

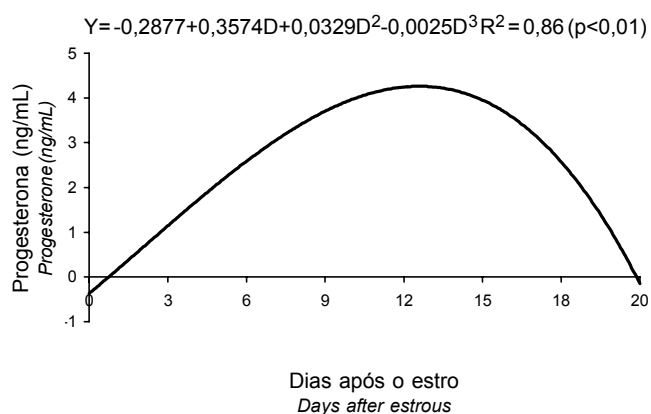


Figura 1 - Concentração plasmática de progesterona em novilhas Nelore, em função dos dias do ciclo estral normal (21 dias).

Figure 1 - Plasma progesterone level in Nelore heifers, related to the days of regular estrous cycle (21 days).

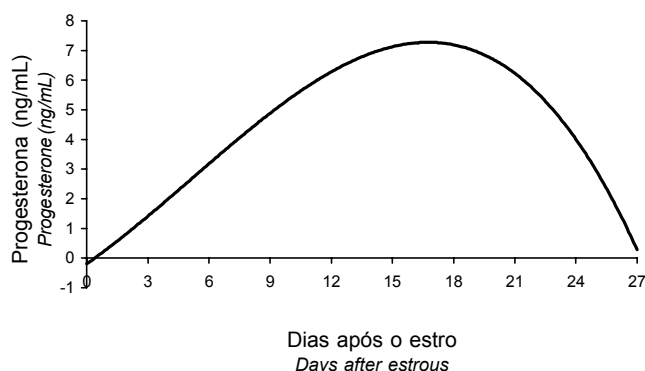


Figura 2 - Concentração plasmática de progesterona em novilhas Nelore, em função dos dias do ciclo estral longo (acima de 25 dias).

Figure 2 - Plasma progesterone level in Nelore heifers related to the days of the prolonged estrous cycle (greater than 25 days).

que, por sua vez, estimula a síntese e secreção de PGF<sub>2a</sub>, hormônio responsável pela luteólise e conseqüente queda nos níveis circulantes de progesterona a níveis basais (< 1,0 ng/mL). Estes achados foram observados, neste experimento, no dia -1 (dia anterior) do próximo estro, corroborando os resultados encontrados por SPICER e ECHTERNKAMP (1986), GUILHERME (1988), DUCHENS et al. (1994) e SUNDERLAND et al. (1994).

WISE et al. (1982) encontraram valores superiores para progesterona sistêmica em gado europeu, a qual se apresentou elevada durante a fase luteal e declinou no final do ciclo estral.

### Conclusões

Ciclos estrais de maior duração (acima de 25 dias) com quatro ondas de crescimento folicular apresentaram concentrações mais elevadas de progesterona plasmática, durante maior período, havendo variações em função do dia do ciclo estral.

### Agradecimento

Ao CNPq e à FAPEMIG, pela concessão de bolsa e pelo financiamento do experimento.

Aos estagiários Daniel, Daniela, Elenice, João, Lincoln, Luiz Otávio, Orlando e Ronaldo, pela valiosa colaboração durante o experimento.

À Dra. Eunice Oba e aos professores e alunos de Pós-graduação do Departamento de Reprodução e

Radiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, pelo auxílio nas análises laboratoriais

### Referências Bibliográficas

- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P. et al. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 94:177-188.
- CAVALIERI, J., RUBIO, I., KINDER, J.E. et al. 1997. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, 47:801-814.
- DUCHENS, M., FORSBERG, M., EDQVIST, L.E. et al. 1994. Effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, estradiol-17 $\beta$  and LH in heifers. *Theriogenology*, 42:1159-1169.
- FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO et al. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47:1489-1505.
- FORTUNE, J.E., SIROIS, J., TURZILLO, A.M. et al. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 43:187-198. (Suppl.)
- GUILHERME, M.M. 1988. Alguns aspectos da dosagem de progesterona em kits. *Zootecnia*, 26(2):119-125.
- MILVAE, R.A., HINCKLEY, S.T., CARLSON, J.C. 1996. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45:1327-1349.
- OLIVEIRA, M. M. N. F. *Dinâmica folicular ovariana e características reprodutivas de vacas leiteiras no pós-parto após tratamentos com busarelina e cloprostenol*. Viçosa, MG: UFV, 1997. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- RHODES, F.M., DE'ATH, G., ENTWISTLE, K.W. 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:265-277.
- SPICER, L.J., ECHTERNKAMP, S.E. 1986. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *J. Anim. Sci.*, 62:428-451.
- SUNDERLAND, S.J., CROWE, M.A., BOLAND, M.P. et al. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.*, 101:547-555.
- TAFT, R., AHMAD, N., INSKEEP, E.K. 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.*, 74:2985-2991.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. 1997. *SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas*. Versão 7.1. Viçosa, MG. 150p. (Manual do usuário).
- WISE, T.H., CATON, D., THATCHER, W.W. et al. 1982. Ovarian function during the estrous cycle of the cow: ovarian blood flow and progesterone release rate. *J. Anim. Sci.*, 45(3):627-637.

Recebido em: 19/10/00

Aceito em: 02/08/01