

TAXA DE OVULAÇÃO E VIABILIDADE EMBRIONÁRIA EM CAPRINOS SUPEROVULADOS COM FOLLTROPIN-V E SUPER-OV

(OVULATION RATE AND EMBRYO VIABILITY IN GOATS SUPEROVULATED WITH FOLLTROPIN-V AND SUPER-OV)

SALLES, H.O.¹; ANDRIOLI, A.¹; SOARES, A.T.²; MOURA SOBRINHO, P.A.³

RESUMO

O trabalho objetivou determinar a taxa de ovulação e a viabilidade dos embriões após a administração de Folltropin-V (T₁) ou Super-ov (T₂) como estimulante à superovulação. Foram utilizadas 35 cabras da raça Saanen sob estro sincronizado com esponjas intravaginais impregnadas de 60mg de acetato de medroxiprogesterona, por 11 dias, associado à aplicação de 50µg de cloprostenol, no nono dia da colocação das esponjas, e ao tratamento superovulatório com início no mesmo dia, recebendo 16 fêmeas 200mg de NIH-FSH-P1 de Folltropin-V e 19 fêmeas 37,5 unidades de NIH-FSH-S1 de Super-ov, fracionadas em seis aplicações, em doses decrescentes, intervaladas por 12 h. No terceiro dia após a remoção das esponjas iniciou-se tratamento antiluteolítico, com flunixin meglumine em oito aplicações de 1,1mg/kg, a cada 12 horas. A observação do estro seguida de uma cobertura por fêmea, teve início 12 horas após a retirada das esponjas, a intervalos de 12h até o final do estro. Entre o sexto e o sétimo dia do início do estro as fêmeas foram submetidas a colheita de embriões por laparotomia. Não se observou diferença estatística significativa (P>0,05) entre os tratamentos quanto ao início do estro, à duração do estro, à percentagem de animais que superovularam e de embriões viáveis, sendo observada diferença estatística significativa (P<0,05) para a taxa de ovulação, apresentando o T₁ maior número de corpos lúteos em relação ao T₂. No entanto, a maior taxa de ovulação pareceu contribuir para que o T₁ apresentasse a menor percentagem de embriões por estruturas recuperadas, tornando os dois fármacos semelhantes (P>0,05) quanto à média de embriões colhidos. Considerando a taxa de ovulação fator de menor importância em relação aos fatores viabilidade embrionária e taxa de embriões recuperados, os dois fármacos proporcionaram resultados equiparáveis.

Palavras Chave: caprino; superovulação; folltropin; super-ov.

ABSTRACT

The objectives of the present experiment were to determine the ovulation rate and the embryo viability after the administration of Folltropin-V (T_1) or Super-ov (T_2) for stimulate superovulation. A total of 35 does of the breed Saanen were synchronized with intravaginal pessaries impregnated with 60mg of medroxyprogesterone acetate, for 11 days, associated with 50 μ g of cloprostenol, in the day 9th, and superovulatory treatment beginning in this same day, using in 16 goats 200mg of the NIH-FSH-P1 of Folltropin-V and in others 19 does, 37.5 unites of the NIH-FSH-S1 of Super-ov, fractionated in six decreased doses at intervals of 12 hours. After three days of the withdrawal of vaginal sponges the treatment with a prostaglandin syntase inibitor, the flunixin meglumine, was began in eight applications of the 1.1mg/kg, with intervals of 12 hours. The estrus observations followed of one fertilization for doe were began after 12 hours of the withdrawal of sponges, twice daily to the estrus and. Between 6th and 7th days after estrus onset the embryos were collected surgically. There weren't statistically difference ($P>0.05$) between the treatments to the estrus onset, to duration of the estrus, to percentage of the females which superovulated and the viable embryos. There was a significant statistical difference ($P<0.05$) to ovulation rate, the greater number of corpus luteum was to T_1 and the lowest was to T_2 . However, the greater ovulation rate might have contributed to show a lowest percentage of embryos and structure recovered, making both the pharmacos similar ($P>0.05$) to recovery rate of embryos. Considering the ovulation rate a secondary factor in relation to viability and to recuperate rate of embryos, two pharmacos showed resembling results.

Key Words: goats; superovulation; folltropin; super-ov

INTRODUÇÃO

Com o uso de hormônios gonadotróficos exógenos é possível se obter um maior número de folículos ovarianos em desenvolvimento, levando a múltiplas ovulações em bovinos (Moor et al., 1984), caprinos (Armstrong et al, 1983a), ovinos (Evans & Armstrong, 1984) e outras espécies. Contudo, a resposta superovulatória está sujeita a grandes variações, as quais podem decorrer de fatores intrínsecos como raça, idade, estágio da lactação, variação individual, e extrínsecos, ou seja, nutrição, saúde, estação do ano e hormônio utilizado (Armstrong & Evans, 1983; Meinecke-Tillman et al., 1987; Doijode et al., 1992; Senn & Richardson, 1992).

Em decorrência da aplicação simplificada e do seu relativo baixo custo, a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) tem sido bastante utilizada. No entanto, são os extratos hipofisários das espécies humana, eqüina, suína, ovina e caprina os

responsáveis pelas respostas mais regulares em caprinos, associada à obtenção de um maior número de embriões viáveis (Armstrong et al., 1983a; 1983b; Del Campo et al., 1985; Pendleton et al., 1992; Baril et al., 1992; Traldi et al., 1996). A superioridade na resposta deve-se a menor concentração de hormônio luteinizante (LH) nesses extratos. Preparações de hormônio folículo estimulante (FSH) com alta relação LH:FSH podem desencadear efeitos prejudiciais à reposta dos ovários como a ativação prematura de oócitos. Em consequência, alguns oócitos são retidos em folículos luteinizados enquanto outros podem ser ovulados e, posteriormente, fecundados mas, por serem envelhecidos contribuirão, subseqüentemente, para o número de embriões anormais (Moor et al., 1984). Desta forma, ressalta-se que o nível sanguíneo de FSH está associado ao número de embriões produzidos enquanto, que o nível de LH, à viabilidade deles (Donaldson, 1985).

Uma variada relação FSH:LH é encontrada nas preparações de hormônio folículo estimulante disponíveis no mercado. Produzir extratos hipofisários enriquecidos com FSH e com baixo nível de contaminação de LH pode propiciar excelentes respostas superovulatórias. Com este objetivo, os laboratórios Vetrepharm e AUSA colocaram a disposição no mercado um FSH com uma alta relação FSH:LH (McNatty et al., 1989; Donaldson, 1994).

Neste contexto, determinar, por espécie, a melhor preparação hormonal, associada a menor dose eficaz, poderá propiciar incrementos apreciáveis nos programas de superovulação. Partindo deste pressuposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a taxa de ovulação e a viabilidade embrionária após a administração do Folltropin-V, Vetrepharm, e do Super-ov, AUSA, buscando definir o que melhor se adequa à fêmeas caprinas da raça Saanen.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, situado no município de Sobral, CE, à latitude de 3°42' Sul e longitude de 40°21' Oeste.

Foram utilizadas 35 cabras da raça Saanen, com condição corporal entre os níveis 2 e 3 e com peso entre 35 e 45 kg.

Os animais foram mantidos em sistema semi-intensivo, onde tinham acesso diário à pastagem nativa da Caatinga, água e sal mineral *ad-libitum*, a capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) no cocho e a 300g, por dia, de uma mistura concentrada contendo 75% de NDT e 18% de proteína bruta.

O estro foi sincronizado utilizando-se esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Promone-E[®], Rhodia-Mérieux), por 11 dias, e aplicação de 50µg de cloprostenol (Ciosin[®], Coopers), 48 horas antes do final do tratamento com progestágeno, quando também se iniciou o tratamento

superovulatório. Os animais foram distribuídos entre tratamentos, T₁ com 16 fêmeas que receberam 200mg de NIH-FSH-P1 de Foltropin-V[®] (Vetrepharm, Ontario, Canadá) e T₂ com 19 fêmeas, nas quais foram aplicadas 37,5 unidades de NIH-FSH-S1 de Super-ov[®] (Ausa, Montreal, Canadá). Em ambos os tratamentos a dose total foi fracionada em seis aplicações decrescentes, intervaladas por 12 horas. As cabras foram observadas para fim de registro do estro, duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde, a partir de 12 horas da retirada das esponjas até o final do estro, e tão logo observadas em estro as fêmeas foram cobertas uma vez a cada observação de estro, por macho apto à reprodução, após exame andrológico.

Objetivando evitar a regressão prematura dos corpos lúteos, índice que varia de 45,05 a 48,40% em cabras superovuladas (Soares et al., 1995; Traldi et al., 1996) e que leva a uma baixa taxa de recuperação de embriões viáveis (Armstrong et al., 1983b), deu-se início às 72 horas após a retirada da esponja, a oito aplicações de flunixin meglumine (Banamine[®], Schering), na dose de 1,1mg/kg de peso vivo, intervaladas por 12 horas.

Entre o 6^o e o 7^o dia após o início do estro (dia 0), todas as fêmeas foram submetidas à laparotomia para observação da resposta ovariana e colheita de embriões. Quarenta e oito horas antes da laparotomia foi iniciado jejum hidroalimentar. Para a intervenção cirúrgica realizou-se medicação pré-anestésica com 0,044mg/kg de sulfato de atropina a 1,0% (Atropina 1% Calbos[®]: Calbos) seguida, dez minutos após, de analgesia com 0,30 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2,0% (Rompun[®]: Bayer) e dez minutos depois, anestesia epidural (espaço lombosacro) com aplicação de 0,2ml/kg de cloridrato de lidocaína a 2,0% (Anestésico Bravet[®]: Bravet). Os animais foram contidos em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal e em ângulo de 60^o, com a cabeça posicionada para baixo. Uma incisão de 7cm foi realizada na linha média a, aproximadamente, 7cm cranial ao úbere. O útero e os ovários foram exteriorizados, para avaliação da resposta ovariana e colheita dos embriões, sendo, posteriormente, reintroduzidos na cavidade abdominal.

Para a colheita de embriões utilizou-se sonda de Foley n^o. 8, que foi introduzida em uma incisão realizada com trocar de 3mm de diâmetro na curvatura maior do corno uterino. Na junção útero-tubárica foi introduzido um catéter de 0,5mm de diâmetro, por onde foi injetado o líquido de colheita a 37°C, ou seja, Solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS) acrescida de 1,0% de soro ovino inativado a 56°C por 30min e de 40mg de garamicina por litro.

Os embriões foram recuperados diretamente em placas de petri posicionadas próximas à sonda de Foley. Cada corno foi lavado, duas vezes, com 40ml de PBS, dividido em duas porções de igual volume. Sob estereomicroscópio, os embriões foram avaliados e classificados segundo o preconizado pela Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE). Somente os embriões de grau 1 (excelente),

2 (bom) e 3 (regular) foram considerados viáveis e transferidos a fresco para receptoras sincronizadas.

Os dados quanto ao início e duração do estro, à taxa de ovulação e à média de embriões colhidos foram submetidos à análise de variância, com comparação entre as médias realizada através do teste t de Student. Utilizou-se o qui-quadrado (χ^2) para analisar a % de fêmeas que superovularam, de embriões viáveis, de fêmeas com folículos anovulatórios e a classificação das estruturas colhidas (Banzatto & Kronka, 1989).

RESULTADOS

Em 100% dos animais do T₁ o estro ocorreu após a retirada das esponjas. Enquanto, no T₂ apenas uma fêmea, não demonstrou sinais clínicos de estro, fato que não contribuiu para diferenciar estatisticamente os dois tratamentos (P>0,05).

Não se observou diferença estatística significativa (P>0,05) entre T₁ e T₂ quanto ao período transcorrido entre a remoção das esponjas e o início do estro: 30,0±11,59 vs. 33,33±9,70 horas; à duração do estro: 27,75±10,48 vs. 27,67±8,00 horas; à percentagem de animais que superovularam: 87,5 (14/16) vs. 68,42 (13/19); à percentagem de embriões viáveis em relação aos embriões colhidos: 87,88 (29/33) vs. 97,89 (93/95) e de fêmeas com folículos anovulatórios: 31,25 (05/16) vs. 26,32 (05/19). Contudo, observou-se diferença estatística significativa (P<0,05) para a taxa de ovulação, sendo superior no T₁ (16,94±9,42) em relação ao T₂ (10,11±6,42). A maior taxa de ovulação observada no T₁ pareceu influenciar, negativamente, a taxa de recuperação de estruturas (T₁=35,79% (97/271) vs. T₂=72,53% (132/182), P<0,05) e de embriões por estruturas recuperadas (T₁=34,02% (33/97) vs. T₂=71,97% (95/132), P<0,05) nesse tratamento. No entanto, se comparada a média de embriões colhidos por fêmea, os dois fármacos, Folltropin-V e Super-ov, comportaram-se de maneira semelhante (P>0,05), 4,13±2,64 vs. 5,94±4,02 embriões, nesta ordem, bem como quanto à média de embriões viáveis, 3,63±2,45 vs. 5,81±3,99 embriões, respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Segundo Moor et al. (1984), a obtenção de um largo e reprodutível número de embriões viáveis após superovulação está na dependência de dois fatores: a presença de folículos responsivos e a administração do hormônio apropriado. Desta forma, a otimização desses fatores a partir do entendimento da dinâmica do desenvolvimento folicular e de seu mecanismo de regulação, ainda é necessária para suprir a demanda de ovócitos e zigotos utilizados em pesquisas básicas, bem como na conservação de espécies ameaçadas de extinção.

O presente experimento reporta boa taxa de ovulação em caprinos após o uso tanto do Folltropin-V como do Super-ov, dois hormônios folículo estimulante suíno de laboratórios distintos.

Analisando as respostas de estros obtidas após o tratamento superovulatório e os resultados apresentados por Baril & Vallet (1990), os quais relatam que o intervalo entre o pico de LH e a ovulação sofre pouca variação entre caprinos superovulados, mas que, no entanto, o intervalo entre o início do estro e o pico de LH é bastante variável, os resultados aqui apresentados sugerem que o intervalo entre o início do estro e o pico de LH possa ser semelhante nos dois fármacos testados, diante do intervalo entre a remoção das esponjas e o início do estro terem sido estatisticamente iguais entre os dois tratamentos.

Para contornar a variação da resposta ovulatória e reduzir a taxa de estruturas não fecundadas, utilizou-se no presente trabalho a monta controlada a cada 12 horas até o final do estro. Contudo, uma alta taxa de ovulação obtida após tratamento com Folltropin-V pareceu influenciar negativamente a taxa de recuperação de estruturas e a obtenção de embriões por estruturas recuperadas, quando comparada a apresentada após superovulação com Super-ov.

Os achados referentes ao número médio de corpos lúteos observados no T_1 , colaboram com os relatos prévios obtidos por McNatty et al. (1989), Holm et al. (1990), Taneja et al. (1991) e Soares et al. (1995), porém foram inferiores aos descritos por Peebles & Kidd (1994), em caprinos. Quanto ao T_2 a taxa de ovulação se assemelhou a observada por Goel & Agrawal (1990), sendo inferior a relatada por Armstrong et al. (1983a), Senn & Richardson (1992) e Pendleton et al. (1992), que trabalharam com caprinos, porém com FSH de outro laboratório.

A taxa de embriões recuperados foi significativamente ($P < 0,05$) reduzida no T_1 em relação a obtida no T_2 e as descritas por McNatty et al. (1989), Holm et al. (1990), Taneja et al. (1991) e Soares et al. (1995). Relatando Pendleton et al. (1992) e Senn & Richardson (1992), taxas de embriões recuperados semelhantes as observadas no T_2 .

Baixa taxa de recuperação de estrutura e embriões como conseqüência de alta taxa de ovulação foi hipótese proposta por Selgrath et al. (1990), os quais acreditam que níveis crescentes de progesterona em caprinos após a superovulação são observados precocemente, podendo inibir o transporte de gametas e a fertilização. Em adição, Evans & Armstrong (1984) relatam ser o transporte de espermatozoides no trato genital de ovelhas, prejudicado após tratamento com progesterona e/ou prostaglandina associados à indução da superovulação. Ainda Armstrong & Evans (1983) citam que ovelhas superovuladas apresentando taxa de ovulação superior a 16 corpos lúteos, após monta natural, exibiram uma reduzida taxa de fecundação quando comparadas a ovelhas com menor taxa de ovulação. No presente experimento, as fêmeas tratadas com Folltropin-V exibiram taxa de ovulação com média de $16,94 \pm 9,42$ corpos lúteos, o que reforça nossa suspeita do fator taxa ovulatória ter influenciado a taxa de fecundação. Em acréscimo, o maior

número de folículos pré-ovulatórios no ovário pode ter prejudicado a captação dos óvulos pelas fímbrias, os quais podem ter sido liberados na cavidade abdominal, contribuindo para a baixa taxa de recuperação de estruturas nas fêmeas com maior resposta ovulatória.

Neste contexto, embora a taxa de ovulação e fecundação tenham diferido entre os dois fármacos, o número médio de embriões recuperados e viáveis foi semelhante, demonstrando que os dois tratamentos foram efetivos em induzir a superovulação em cabras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G.M. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v. 19, n.1, p. 31-42, 1983.
- ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M.; RALPH, M.M.; SEAMARK, R.F. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *Journal Reproduction and Fertility*, v.67, n.2, p.395-401, 1983a.
- ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M.; SEAMARK, R.F. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal Reproduction and Fertility*, v.67, n.2, p.403-410, 1983b.
- BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; VALLET, J.C.; BECKERS, J.F.; SAUMANDE, J. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. In: Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, 8, 1992. *Proceedings...* Lyon-France, v.1, p.126, 1992.
- BARIL, G.; VALLET, J.C. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology*, v.34, n.2, p.303-311, 1990.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação Agrícola*. FUNEP/FCAP-UNESP, Jaboticabal-SP, 1989. 247p.
- DEL CAMPO, C.H.; SALAS, F.; GATICA, R.; DEL CAMPO, M.R. Different methods of superovulation using horse anterior pituitary extract (HAP) in goats during breeding season. *Theriogenology*, v.23, n.1, p.186, 1985.

- DOIJODE, S.V.; BAKSHF, S.A.; PARGAONKAR, D.R.; MARKANDEYA, N.M. Studies on synchronization of oestrus, superovulation and recovery of embryos in goats. *Indian Journal of Animal Science*, v.62, n.9, p.846-848, 1992.
- DONALDSON, L.E. The development of super-ov[®] from FSH-P[™]. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 12, n.1, p. 17-25, 1994.
- DONALDSON, L.E. LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow. *Theriogenology*, v.23, p.441-447, 1985.
- EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, n.1, p.47-53, 1984.
- GOEL, A.K.; AGRAWAL, K.P. Superovulation and embryo collection in Jamunapari goats. *Theriogenology*, v.33, n.1, p.232, 1990.
- HOLM, P.; PETERSEN, B.A.; KROGH, K.; DAGNAES-HANSEN, F.; LAURSEN, I.A. *Theriogenology*, v.33, n.1, p.250, 1990.
- McNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; BALL, K.; MASON, A.; SIMMONS, M.H. Superovulation and embryo recovery in goats treated with Ovagen and Folltropin. *New Zealand Veterinary Journal*, v.37, p. 27-29, 1989.
- MEINECKE-TILLMAN, S.; EVERS, P.; MEINCKE, B. Relationships between PMSG-plasma concentrations and ovarian response after superovulatory treatment in Merino ewes. *Theriogenology*, v.27, n.1, p.259, 1987.
- MOOR, R.M.; KRUIP, Th.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? *Theriogenology*, v.21, n.1, p.103-116, 1984.
- PEEBLES, I.R.; KIDD, J.F. Single treatment superovulation in the Cashmere goat using porcine follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, v.41, n.1, p.71, 1994.
- PENDLETON, R.J.; YOUNGS, C.R.; RORIE, R.W.; POOL, S.H.; MEMON, M.A.; GODKE, R.A. Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotropin for superovulation of dairy goats. *Small Ruminant Research*, v.8, n.3, p.217-224, 1992.

- SELGRATH, J.P.; MEMON, M.A.; SMITH, T.E.; EBERT, K.M. Collection and transfer of microinjectable embryos from dairy goats. *Theriogenology*, v.34, n.6, p.1195-1205, 1990.
- SENN, B.J.; RICHARDSON, M.E. Seasonal effects on caprine response to synchronization of estrus and superovulatory treatment. *Theriogenology*, v.37, n.3, p.579-585, 1992.
- SOARES, A.T.; SIMPLÍCIO, A.A.; PINHEIRO-ANDRIOLI, A.; SALLES, H.O.; MOURA-SOBRINHO, P.A.; SOARES, B.A.; MORAES, J.B.; WANDERLEY, K.O. Uso de flunixin meglumine para impedir a regressão prematura de corpos lúteos após a superovulação em caprinos. *ARS Veterinária*, v. 11, n. 2, p. 112-113, 1995.
- TANEJA, H.; PAWSHE, C.H.; GURON, C.S.; SINGH, G.; TOTEY, S.M.; TALWAR, G.P. Superovulation of Barbari goats with folltropin: the effect of dose. *Theriogenology*, v.35, n.1, p.280, 1991.
- TRALDI, A.S.; VISINTIN, J.A.; MIZUTA, K.; DELA LIBERA, A.M.P.; SILVA, E.C.; RODRIGUES, P.H.M. Resposta superovulatória de caprinos à gonadotrofina da menopausa humana (hMG). *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre*, v.24, p.218, 1996. (Supl.).