

RESPOSTA OVARIANA E PERFIL DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DE NOVILHAS TRATADAS COM INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE FSH E REFORÇO INTRAMUSCULAR APÓS 48 HORAS¹

ANTONIO CAMPANHA MARTINEZ², RAFAEL HERRERA ALVAREZ³, RITA MARIA LADEIRA PIRES³, GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA⁴

¹Recebido para publicação em 31/08/07. Aceito para publicação em 16/10/07.

²Centro de Ciências Agrárias, Campus Avançado de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estrada da Paca, s/nº, CEP 87507-190, Umuarama, PR, Brasil. E-mail: acmartinez@uem.br

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia (IZ), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Nova Odessa, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Fisiologia, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

RESUMO: A injeção única de FSH, aplicada por via subcutânea (sc) é suficiente para induzir uma superovulação em bovinos. No entanto, a injeção sc aumenta as concentrações plasmáticas de FSH somente durante um curto período, de forma que uma parte dos folículos estimulados podem parar seu crescimento na ausência de níveis adequados de FSH na etapa final de maturação. Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta ovariana de novilhas tratadas com uma sub-dose intramuscular (im) de FSH 48 horas após a injeção sc inicial. Quinze novilhas mestiças foram tratadas com um dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR B), juntamente com uma injeção im de 2,5mg de benzoato de estradiol. Quatro dias após, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais e receberam os seguintes tratamentos: injeção sc de FSH suína (pFSH) na dosagem de 400 (grupo 1) e 320 (grupo 2) UI ou injeções im em doses decrescentes (80-80; 60-60; 40-40 e 20-20UI) durante 4 dias consecutivos (grupo 3). Três dias após, retirou-se o CIDR-B, aplicou-se uma injeção im de 150 mcg de cloprostenol e o grupo 2 recebeu, adicionalmente, uma injeção im de 80UI de pFSH. A inseminação foi realizada em todos os grupos 48 e 62 horas após a injeção do cloprostenol. Durante o período da superovulação foram monitoradas, diariamente, o crescimento folicular e as concentrações plasmáticas do pFSH. No dia 7 após a IA realizou-se a coleta de embriões e a contagem dos corpos lúteos (CL). Os dados da resposta ovariana foram submetidos à análise de variância (Proc GLM do SAS). Não houve diferença do padrão de crescimento folicular entre os grupos. As concentrações plasmáticas de pFSH aumentaram nas primeiras horas após a injeção sc ou im e retornaram aos níveis basais após 24 horas nos grupos 1 e 2, enquanto no grupo 3 mantiveram-se elevadas até o final dos tratamentos. O grupo 2 apresentou um segundo pico após a injeção im de pFSH. Não houve diferença no número de CL ($8,4 \pm 1,7$; $10,2 \pm 2,8$ e $11,0 \pm 2,6$) e embriões recuperados ($5,3 \pm 1,8$; $6,1 \pm 2,1$ e $6,3 \pm 2,0$) para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente ($p > 0,05$). Conclui-se que a injeção adicional de FSH não aumenta a resposta ovariana de novilhas superovuladas com dose única sc de FSH.

Palavras-chave: superovulação, novilhas, FSH, via sc

OVARIAN RESPONSE AND FOLLICULAR DEVELOPMENT IN HEIFERS TREATED WITH FSH INJECTED BY SUBCUTANEOUS ROUTE FOLLOWED BY INTRAMUSCULAR BUSTER 48 LATER.

ABSTRACT: A single injection of FSH applied by subcutaneous (sc) route induces superovulation in bovines. However, sc injection results in a brief surge in FSH plasmatic levels. Therefore, we speculate that FSH may be necessary to instigate the final development of some follicle. This study was done to evaluate the ovarian response of heifers treated with a intramuscular (im) sub-

dose of FSH 48 hours after the initial sc injection. Fifteen crossbreed heifers were treated with a progestagen vaginal implant (CIDR-B) and injected im with 2.5 mg estradiol benzoate. Four days later, heifers were assigned randomly in 3 groups of 5 animals each and superovulated with pFSH as follows: group 1 and 2 received a sc injection of 400IU and 380 IU, respectively, while group 3 received 400 IU injected im in decreasing sub-doses (80-80; 60-60; 40-40 e 20-20UI) at 12-hour intervals during four consecutive days. The CIDR-B was withdrawn forty-eight hours after the initial FSH injection and heifers were injected im with 150-mcg of cloprostenol. Additionally, group 2 was injected im with 80 IU of pFSH. Heifers from all groups were inseminated 48 and 62 hours after the cloprostenol injection. Evolutions of follicular growth and pFSH plasmatic levels were monitored daily during the superovulation process. Embryo collection and corpora lutea (CL) estimation were done seven days after insemination. Data were submitted to analysis of variance (Proc GLM do SAS). There was no significant difference in follicular growth among the groups. Plasmatic pFSH concentration increases in the first few hours after the initial im or sc injection and decrease to basal levels after 24 hours in groups 1 and 2, while pFSH concentration of group 3 remained high until the end of the treatment. Group 2 had a second surge after the additional im injection of pFSH. There was no difference in CL number (8.4 ± 1.7 ; 10.2 ± 2.8 and 11.0 ± 2.6) and recovered embryos (5.3 ± 1.8 , 6.1 ± 2.1 and 6.3 ± 2.0) of groups 1; 2 and 3, respectively. It was concluded that an additional sub-dose of FSH, injected 48h after one single sc injection of FSH, does not improve the superovulatory response of heifers.

Key words: heifers, FSH, route, superovulation.

INTRODUÇÃO

Segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, o Brasil realiza anualmente aproximadamente 20 000 coletas de embriões de vacas superovuladas (THIBIER, 2004). Esse índice coloca o País no segundo lugar mundial no uso da tecnologia de transferência de embriões, somente superado pelos EUA. Em média, cada coleta produz de 4 a 6 embriões transferíveis, com extremos individuais que variam de 0 a mais de 50 embriões (ALVAREZ, 1994). Além dessa variabilidade na resposta, tal vez o maior problema dos técnicos que atuam nesta área deriva da laboriosidade de aplicar o tratamento hormonal destinado à estimulação ovariana. Com efeito, devido à curta meia-vida do FSH (hormônio utilizado para induzir a superovulação), existe a necessidade de aplicar doses bicotidianas do hormônio durante 4 dias, o que resulta em manipulações excessivas dos animais para aplicação das injeções.

Uma alternativa ao tratamento intramuscular (im) de FSH foi proposta inicialmente por Bo *et al.* (1991). Utilizando uma única dose de FSH aplicada por via subcutânea (sc), os autores não observaram diferenças na produção de embriões quando comparado com injeções múltiplas im. Esses resultados foram posteriormente confirmados em diversos trabalhos com raças taurinas (Bo *et al.*, 1994) e zebuínas (ALVAREZ *et al.*, 1999). Contudo, alguns estudos rela-

taram uma menor resposta ovariana quando utilizada a via sc (TAKEDOMI *et al.*, 1995; KELLY *et al.*, 1997). Os autores sugerem que a menor produção de embriões seria decorrente do limitado estímulo da injeção única de FSH visto que, diferentemente do tratamento im em que as concentrações plasmáticas de FSH são mantidas relativamente elevadas durante todo o período de crescimento folicular, na injeção única sc as concentrações de FSH retornam aos níveis basais aproximadamente 36 a 48 horas após o início da aplicação (TAKEDOMI *et al.*, 1995). Dessa forma, o aporte de uma quantidade adicional de FSH nesse período deve permitir a continuidade do crescimento até o estágio preovulatório dos folículos que, na ausência de FSH, seriam destinados a regredir. LOVIE *et al.* (1994) sugeriram injetar 75% da dose por via sc e os restantes 25% (por via im) após 48 horas. Com essa estratégia os autores conseguiram melhorar significativamente a produção de embriões de vacas Holandesas com pouca gordura subcutânea. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de crescimento folicular e a resposta ovariana de novilhas superovuladas com dose única sc de FSH suplementada, 48 horas após, com um reforço im.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido na Unidade Laboratorial de Referência de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal do Centro de P&D Genéti-

ca e Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia, localizado em Nova Odessa, SP.

Foram utilizadas 15 novilhas mestiças de aproximadamente 30 meses de idade e condição corporal variando de 3 a 4 (num escore de 1 a 5), mantidas em condições padrão de manejo em pastagens de *Panicum maximum* cv. Tanzania, sendo que no período da seca foram suplementadas com silagem de milho. Sal mineral e água ficaram disponíveis ad libitum. Após um período de adaptação de aproximadamente um mês, os animais foram tratados com um dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR-B®, InterAg, New Zealand), juntamente com uma injeção im de 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, Brasil). Quatro dias após, os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos de cinco animais cada, sendo que os grupos 1 e 2 receberam, respectivamente, 400 e 320 UI de FSH de hipófise suína -FSHp (Pluset®, Lab. Calier, Espanha) aplicadas em uma única dose subcutânea (sc) na região escapulocaudal. Os animais do grupo 3 receberam, por via im, 400UI administradas em doses decrescentes (80-80; 60-60; 40-40 e 20-20UI), duas vezes ao dia, durante quatro dias. No dia sete (manhã), os animais de todos os grupos receberam uma dose luteolítica do análogo de prostaglandina F2, cloprostenol (Veteglan®, Lab. Calier, Espanha) e o grupo 2 recebeu, adicionalmente, uma injeção im de 80 UI de Pluset. O dispositivo CIDR-B® foi retirado 12 horas após a injeção do Veteglan®. A inseminação foi realizada sistematicamente 48 e 62 horas após a injeção do Veteglan®, independentemente da manifestação de cio.

Avaliação da resposta ovariana.

A evolução do crescimento folicular foi acompanhada diariamente, durante quatro dias, a partir do início dos tratamentos de superovulação, utilizando um equipamento de ultra-som com transdutor linear de 5 MHz (Pie Medical 200 Vet). Para cada novilha, foi registrado o número de folículos de tamanho pequeno (< 4mm), médio (4-9 mm) e grande (>9mm) de ambos ovários. A coleta dos embriões, por via cervical, foi realizada sete dias após a inseminação e os embriões recuperados foram classificados conforme os critérios morfológicos definidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON e NELSON, 1998). Um dia após a coleta, os ovários foram retirados (após cirurgia convencional) e as estruturas (corpos lúteos) contadas diretamente na peça.

Coleta de sangue e dosagens hormonais

Amostras de sangue (12 ml) da veia jugular (tubos vacutainer B&D com 143 USP de heparina) foram coletadas no período de 124 horas, a partir do início da superovulação. As coletas foram realizadas com uma frequência de três horas durante as primeiras 48 horas e posteriormente a cada oito horas até o momento da inseminação. Após centrifugação [10 minutos a 1600g a 4°C - centrífuga Ependorf 5804 R], o plasma foi recuperado e estocado a -20°C. A quantificação de FSH foi realizada por técnicas validadas de radioimunoensaio para FSH bovino utilizando os padrões de referência USDA-bFSH para iodinação e anti-soro NIDDK-anti-oFSH (BOLT e ROLLINS, 1983). A sensibilidade do método foi de 0,1ng ml⁻¹ e os coeficientes de variação intra e entre ensaios foram de 10,9% e 13,2%, respectivamente.

Análise estatística dos dados

A evolução das concentrações plasmáticas de FSH no tempo foi analisada utilizando o método de parcelas subdivididas (split-plot). A resposta ovariana (número de corpos lúteos, número total de embriões e número de embriões viáveis) foi submetida à análise da variância (Proc GLM do SAS). O teste de Tukey foi utilizado para discriminar as diferenças entre as médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Os resultados do crescimento folicular induzido pelos três diferentes tratamentos de superovulação são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa no grau de estímulo entre os três tratamentos (p<0,05).

No início do tratamento, o número médio de folículos de tamanho inferior a quatro mm variou de 14,0 a 19,2. Essa média de folículos < 4mm é semelhante à média de 21-23 folículos relatada por PURWANTARA *et al.* (1994) utilizando um transdutor de 7,5 MHz. O transdutor de cinco MHz permitiu acompanhar com relativa precisão o crescimento até o estágio preovulatório dos menores folículos detectados. Esses folículos, junto com os de maior diâmetro (folículos em crescimento ou em início de atresia), constituíram o número total de folículos preovulatórios observados no dia da inseminação.

Aparentemente, a evolução do crescimento folicular não foi afetada pelas variações na concentração do hormônio (Figura 1).

Tabela 1. População folicular (média \pm epm) de novilhas mestiças superovuladas com FSHp utilizando dose única por via subcutânea (sc), 75% da dose por via sc seguida de 25% por via intramuscular (sc+im) e sub-doses decrescentes im durante 4 dias (D0 = início dos tratamentos)

Tratamento	Classe (mm)	D0	D1	D2	D3	D4
sc	< 4	14,0 \pm 3,3	13,6 \pm 3,9	11,6 \pm 4,3	4,4 \pm 1,3	0,4 \pm 0,4
	4-9	1,2 \pm 0,9	5,6 \pm 2,8	7,2 \pm 2,3	3,2 \pm 1,7	4,4 \pm 0,8
	>9	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,9	14,0 \pm 0,4	15,2 \pm 4,7
sc + im	< 4	19,2 \pm 3,4	19,6 \pm 3,9	18,4 \pm 3,3	2,4 \pm 2,2	0,0 \pm 0,0
	4-9	0,8 \pm 0,9	5,6 \pm 1,9	8,8 \pm 3,3	8,8 \pm 3,6	8,0 \pm 2,7
	>9	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,9	18,0 \pm 3,4	20,4 \pm 4,8
im	< 4	14,0 \pm 3,3	13,6 \pm 3,9	11,6 \pm 4,3	4,4 \pm 1,3	0,4 \pm 0,4
	4-9	1,2 \pm 0,9	3,6 \pm 2,8	7,2 \pm 2,3	3,2 \pm 1,7	4,4 \pm 0,8
	>9	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,9	14,4 \pm 3,6	15,2 \pm 4,7

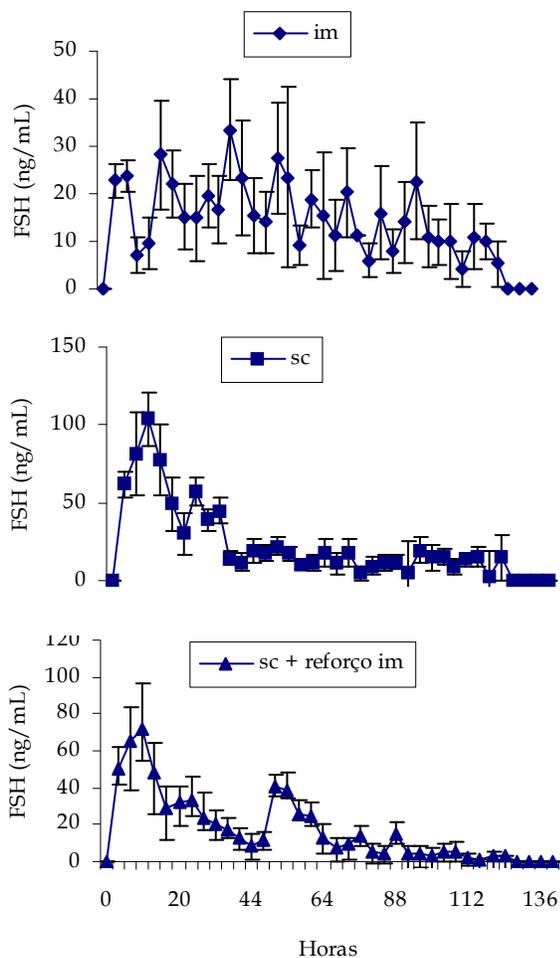


Figura 1. Evolução das concentrações plasmáticas de FSH-p de novilhas mestiças tratadas com injeções intramusculares de FSHp em sub-doses decrescentes durante quatro dias (im); em dose única subcutânea (sc) ou em dose sc seguida, 48 horas após, de sub-dose im (sc + reforço im)

As alterações seqüenciais de FSHp do presente estudo correspondem às observadas por outros autores (DEMOUSTIER *et al.*, 1988; TAKEDOMI *et al.*, 1995). No grupo 1, houve um drástico aumento nas concentrações plasmáticas de FSHp alcançando o máximo valor nove horas após a injeção, seguido de uma queda constante até retornar aos níveis basais, 21 horas após. O grupo 2 apresentou um padrão semelhante ao grupo 1, porém, o reforço im de FSHp aplicado 48 horas após a injeção sc resultou em uma elevação significativa de curta duração dos níveis do hormônio. Os níveis plasmáticos de FSHp do grupo 3 aumentaram 3 horas após a primeira injeção e permaneceram relativamente altos durante todo o período do tratamento, com oscilações decorrentes das injeções periódicas do hormônio.

Com exceção de três novilhas que não responderam à superovulação (uma de cada tratamento), todos os animais apresentaram mais de três corpos lúteos, evidenciados diretamente na peça após a coleta de embriões. Não é claro o motivo de alguns animais ser refratários ao estímulo hormonal. Provavelmente estão envolvidos fatores genéticos ou fisiológicos que limitam a resposta dos ovários à ação das gonadotrofinas. Com efeito, protocolos direcionados a suprimir a dominância folicular ou aumentar o número de folículos responsivos às gonadotrofinas reduziram, mas não eliminaram a variabilidade da resposta aos tratamentos de superovulação (BARUSELLI *et al.*, 2006).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da resposta ovariana (número de CL) e da produção de embriões entre os tratamentos (Tabela 2).

Estudos prévios têm sugerido que a exposição dos ovários a uma concentração excessivamente ele-

vada de FSHp pode influenciar negativamente o desenvolvimento folicular e a ovulação, com um concomitante decréscimo na produção e na qualidade dos embriões (KELLY *et al.*, 1997; KANITZ *et al.* 2002). Entretanto, no presente estudo não houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de embriões recuperados ou transferíveis. Esses dados confirmam resultados prévios com vacas (ALVAREZ *et al.*, 1999, ALVAREZ *et al.*, 2006) ou novilhas (BO *et al.*, 1991; HOCKLEY *et al.*, 1992; BO *et al.*, 1994; BO *et al.*, 1996; KELLY *et al.*, 1997) superovuladas com dose única sc e demonstram que esse procedimento pode ser uma opção viável ao uso de injeções múltiplas por via im. Por outro lado, LOVIE *et al.* (1994), trabalhando com vacas holandesas com baixa condição corporal obtiveram um aumento na produção de embriões quando injetaram 25% da dose inicial de pFSH (com baixo conteúdo de LH) dois dias após a injeção sc. É provável que as diferenças entre os estudos sejam devidas, entre outros, a diferenças relacionadas com a fonte do hormônio, raça, ambiente ou condição corporal dos animais.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, concluiu-se que, em novilhas apresentando uma condição corporal uniforme, a injeção adicional de FSH não aumenta a resposta ovariana de novilhas superovuladas com dose única sc de FSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. *Zootecnia*, v.32 (ún.), p.3-10, 1994.
- ALVAREZ, R.H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C. Resposta ovariana e produção de embriões de vacas superovuladas com Pluset ou Folltropin em dose única subcutânea. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Rio Grande do Sul*, v.34, n.1, p.516, 2006.
- ALVAREZ, R.H. *et al.* Superovulação de vacas nelore com dose única de FSH aplicada por via subcutânea. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, v. 27, n.1, p.99, 1999.
- BARUSELLI, P.S. *et al.* Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.65, n.1, p.77-88, 2006.
- BO, G.A. *et al.* The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology*, v.35, p.186, 1991.
- BO, G.A. *et al.* Superovulatory response to a single subcutaneous injection of folltropin-v in beef-cattle. *Theriogenology*, v.42, p.963-975, 1994.
- BO, G.A. *et al.* Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, v.45, n.5, p.897-910, 1996.
- BOLT, D.J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. *Journal of Animal Science*, v.56, p.146-154, 1983.
- DEMOUSTIER, M.M. *et al.* Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, v.30, n.2, p.379-86, 1988.
- HOCKLEY, D.K. *et al.* Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin-V in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology*, v.37 p.224, 1992. (Abstr.)
- KANITZ, W. *et al.* Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development*, v.42, p.587-599, 2002.
- KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F. Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, v.46, p.1-14, 1997.
- LOVIE, M. *et al.* The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in Holstein cows. *Theriogenology*, v.41, p.241, 1994. (abstr.)
- ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*, Savoy, IL: 1998. p.103-134.
- PURWANTARA, B. *et al.* Follicular development and embryo recovery following 3 versus 8 FSH injections in heifers. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.35, n.1, p.89-92, 1994.
- TAKEDOMI, T. *et al.* Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, v.43, p.1259-1268, 1995.
- THIBIER, M. Data Retrieval Committee Annual Report, 2004. Disponível em: http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2004.pdf.