

# EFEITO DO “PRIMING” COM FSH OU FSH-LH NO INÍCIO DO CICLO ESTRAL SOBRE A RESPOSTA OVARIANA DE VACAS SUPEROVULADAS<sup>1</sup>

JOÃO BATISTA PEREIRA DE CARVALHO<sup>(2,3)</sup>; RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>2</sup>; OMAR MIGUEL<sup>4</sup>; MARIA INÊS DE AQUINO BARBOSA CARVALHO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à FMVZ, USP, SP.

<sup>2</sup>Centro de Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Caixa postal 60, 13460-000, Nova Odessa, SP.

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas Zootécnicas “Geraldo José Rodrigues Alckmin”, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 07, 12400-000, Pindamonhangaba, SP. E-mail: izpinda@iconet.com.br

<sup>4</sup>Departamento de Reprodução Animal, FMVZ, USP, SP

RESUMO: O presente experimento avaliou o efeito do pré-tratamento com FSH puro ou parcialmente purificado no início do ciclo estral (“priming”), sobre a resposta ovariana de vacas superovuladas no meio do ciclo. Sessenta vacas Mantiqueira foram distribuídas ao acaso em três grupos de 20 animais cada. Nos dias 3 e 4 do ciclo estral, os grupos 1 e 2 receberam 2,5 mg de FSH puro ou 50 UI de FSH-LH (relação FSH:LH de 1:1), equivalente a 10% da dose utilizada para superovulação, respectivamente. O grupo 3 (controle) recebeu soro fisiológico (NaCl 0,9%). Todos os animais foram superovulados entre os dias 9 e 12 do ciclo com 500 UI de FSH-LH, administradas em doses decrescentes, 2 vezes por dia durante 4 dias. No terceiro dia foi aplicada uma dose luteolítica de cloprostenol e a cobertura realizada com reprodutores de comprovada fertilidade. A resposta ovariana foi avaliada 6 a 8 dias após a cobertura pela contagem direta dos corpos lúteos (CL) nos ovários e pelo número e qualidade dos embriões recuperados após sacrifício dos animais. Não foi observada diferença significativa no número médio de CL observado nos três grupos ( $13,00 \pm 1,32$ ;  $13,69 \pm 1,25$ ;  $12,75 \pm 1,32$ , Grupos 1, 2 e 3, respectivamente) nem no número médio de embriões coletados ( $7,96 \pm 0,68$ ;  $9,56 \pm 0,67$ ;  $7,77 \pm 0,68$ , Grupos 1, 2 e 3, respectivamente). Por outro lado, foi observado um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no número médio de embriões transferíveis do grupo 2 ( $7,53 \pm 0,49$ ) em relação ao grupo controle ( $5,30 \pm 0,50$ ), mas não ao grupo 1 ( $6,23 \pm 0,50$ ), sendo que o grupo controle não diferiu estatisticamente do grupo 1. Estes resultados mostram que o “priming” com FSH puro ou parcialmente contaminado com LH não aumenta o número de embriões recuperados de vacas superovuladas.

Palavras chave : Bovinos, embrião, “priming”, superovulação.

## *EFFECT OF PRIMING WITH FSH OR FSH-LH IN THE BEGINNING OF OESTRUS CYCLE ON THE OVARIAN RESPONSE OF SUPEROVULATED COWS.*

ABSTRACT: This trial evaluated the effect of priming with FSH or FSH partially purified on the subsequent ovarian response of cows superovulated in the middle of cycle. Sixty cows of the Mantiqueira breed were randomly divided in three groups of 20 animals each. On day 3 and 4 of the estral cycle, groups 1 and 2 received 2.5 mg of FSH-pure and 50 UI de FSH (ratio FSH:LH = 1:1), respectively, while the group 3 (control) received 0.9% NaCl. All cows were superovulated on day 9 to 12 of the estral cycle using 500 UI of FSH-LH administered in decreasing doses, twice a day, during four days. A luteolytic dose of cloprostenol was injected in the morning of the third day of superovulation and the cows were mating with bulls of good fertility approximately 48 hours latter. The ovarian response was evaluated 6 to 8 days after

matting by direct counting of follicles and corpora lutea (CL) on the ovary and by embryo recovery from uterine horns after slaughtering the cows. There was no significant difference in the mean number of CL ( $13.00 \pm 1.32$ ;  $13.69 \pm 1.25$ ;  $12.75 \pm 1.32$ , groups 1, 2 e 3, respectively) or embryos recovered ( $7.96 \pm 0.68$ ;  $9.56 \pm 0.67$ ;  $7.77 \pm 0.68$  groups 1, 2 e 3, respectively). There was a significant increase ( $P < 0,05$ ) in the mean number of transferable embryos of group 2 ( $7.53 \pm 0.49$ ) compared to control ( $5.30 \pm 0.50$ ), but not to group 1 ( $6.23 \pm 0.50$ ) while the group 1 was not different from the control. These results showed that the priming with FSH pure or partially contaminated with LH do not increase the quantity of recovered embryos from superovulated cows.

Key words : Bovine, embryo, priming, superovulation.

## INTRODUÇÃO

Os avanços alcançados com os métodos de coleta não-cirúrgica e o congelamento de embriões na década de 70, possibilitaram a utilização da transferência de embriões em nível comercial. O desenvolvimento desta técnica tem contribuído também na geração de novos conhecimentos dos processos relativos à ovulação, fecundação, pré-implantação dos embriões, teratogênese e transmissão vertical de doenças. No entanto, a variabilidade e a falta de previsibilidade das respostas ovarianas aos diversos tratamentos de superovulação constituem um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento de programas de transferência de embriões em bovinos (LERNER *et al.*, 1986, ALVAREZ, 1994).

Diversos estudos indicam que um importante fator na resposta superovulatória é a população de folículos de tamanho médio (4-8 mm) presentes no ovário no momento do tratamento com gonadotrofinas exógenas (GONG *et al.*, 1993). A presença desses folículos tem sido relacionada à elevação dos níveis de FSH que ocorre naturalmente logo após a ovulação (DOBSON, 1978). Portanto, o aumento dos níveis de FSH pela administração de FSH exógeno nesse período teoricamente deveria influenciar o recrutamento e/ou seleção desses folículos (BOLAND *et al.*, 1991).

Apoiados nessa hipótese, diferentes equipes avaliaram o efeito da administração de pequenas quantidades de FSH no início do ciclo (método comumente chamado "priming") no aumento da produção de embriões após um tratamento de superovulação, iniciado no meio do ciclo.

Entretanto, os resultados obtidos foram variáveis e mesmo contraditórios, pois enquanto alguns autores constataram um efeito positivo (RAJAMAHENDRAN *et al.*, 1987; WARE *et al.*, 1987; TOUATI *et al.*, 1989, 1991), outros não observaram qualquer efeito na resposta superovulatória (RIEGER *et al.*, 1988; GOULDING *et al.*, 1990; GRAY *et al.*, 1992) ou inclusive uma redução significativa na taxa de ovulação e no número de embriões recuperados (LUSSIER e CARRUTHERS, 1989; GRASSO *et al.*, 1989; GUILBAULT *et al.*, 1990).

Uma das explicações dadas para a falta de resposta seria a presença de quantidades relativamente elevadas de LH no FSH utilizado no "priming". Os resultados de TOUATI *et al.* (1989) utilizando FSH puro parecem sustentar essa hipótese, entretanto, nesse trabalho não foi utilizado um grupo controle, tratado com FSH adicionado de LH. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do "priming" utilizando FSH puro ou FSH contaminado com LH na posterior resposta à superovulação em bovinos

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas vacas do ecótipo Mantiqueira, com lactação encerrada, sem histórico de problemas reprodutivos e tendo pelo menos uma parição. Os animais foram mantidos em pastagem de *Braquiaria decumbens*, com suprimento mineral e água "ad libitum". Durante a estação seca do ano foram fornecidos 30 kg de silagem de milho no cocho além de 2 kg de concentrado para cada animal, durante o período experimental. Os critérios na seleção dos animais foram

baseados na observação de pelo menos dois cio regulares consecutivos. A sincronização do cio anterior ao experimento foi realizada pela administração de 0,5 mg de análogo de prostaglandina F2 $\alpha$ , cloprostenol (CIOSIN, Lab. Cooper) pela via intramuscular (i.m.) após confirmação da presença de um corpo lúteo (CL).

Sessenta vacas que manifestaram cio foram distribuídas ao acaso em três grupos de 20 animais cada. Nos dias 3 e 4 do ciclo estral, os grupos 1 e 2 receberam, por via i.m. 2,5 mg de FSH puro (doado pelo Dr. K. Touati da Universidade de Liege, Bélgica) e 50 UI de FSH-LH (Pluset, Lab. Serono), o qual contém uma relação FSH-LH de 1:1. Esses valores correspondem a 10% da dose utilizada para induzir uma superovulação. O grupo 3 (controle) recebeu soro fisiológico (NaCl 0,9%). Todos os animais foram superovulados entre os dias 9 e 12 do ciclo com 500 UI de Pluset, administradas em doses decrescentes (100-100; 75-75; 50-50 e 25-25 UI) com intervalo de 12 horas durante 4 dias. No terceiro dia após o início da superovulação, os animais receberam 2 injeções de 0,5 mg de cloprostenol com intervalo de 12 horas. Os animais em cio foram levados para serem cobertos (monta natural) por touros de comprovada fertilidade da mesma raça. A resposta ovariana foi avaliada 6 a 8 dias após a cobertura pela contagem direta dos CL nos ovários e pelo número e qualidade dos embriões recuperados após sacrifício dos animais.

A coleta dos embriões foi realizada num período não superior a 20 minutos após a recuperação do trato genital, com 100 ml de PBS em cada corno uterino, conforme metodologia descrita por ALVAREZ *et al.* (1991). A avaliação da qualidade dos embriões foi feita em microscópio estereoscópio com aumento de 60 x, segundo as características estabelecidas pelo INRA (1980).

As análises estatísticas foram realizadas pelo método dos quadrados mínimos, descrito por HARVEY (1990). Foi usado o modelo 1 deste programa, que se refere ao modelo fixo abaixo descrito,

$$Y_{ij} = u + F_i + e_{ij}$$

onde:  $Y_{ij}$  = variáveis dependentes estudadas.

$F_i$  = representa um conjunto de efeitos fixos: tratamentos, classe de idade e peso do animal.

$u$  = média

$e_{ij}$  = resíduo

Variáveis dependentes estudadas:

TCLABT = nº total de corpos lúteos observados

NTE = nº total de estruturas coletadas

NTT = nº total de embriões transferíveis

PET = percentagem de embriões transferíveis

PENT = percentagem de embriões não transferíveis

As comparações entre as médias, para os efeitos significativos foram feitas pelo teste F e pelo teste "t" de Student.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, estão representadas as médias e erros padrões dos tratamentos hormonais para as três variáveis estudadas. O número de ovulações, avaliado pela contagem direta do número de CL nos ovários após o abate, mostrou não existir diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Esses resultados sugerem que, diferentemente do efeito do "priming" com GH aplicado no sétimo dia do ciclo (GONG *et al.*, 1993) o "priming" com FSH puro ou contaminado com LH foi ineficiente para aumentar o número de folículo de tamanho médio no momento do tratamento de superovulação. A metodologia de avaliação da resposta ovariana utilizada no presente experimento não deixa lugar a dúvidas quanto à taxa de ovulação. Isto é importante, pois a estimativa da taxa de ovulação realizada por palpação retal na maioria dos relatos sobre o tema, é bastante subjetiva e pouco eficiente quando mais de 10 CL estão presentes nos ovários (GUAY e BEDOYA, 1981; MONNIAUX *et al.*, 1983.

**Quadro 1. Resposta ovariana de vacas superovuladas no meio do ciclo após um pré-tratamento com FSH, FSH-LH ou solução fisiológica (controle) no início do ciclo**

TRATAMENTO	CL	ER	ET
FSH	13,00 ± 1,32	7,96 ± 0,68	6,23 ± 0,50ab
FSH-LH	13,69 ± 1,25	9,56 ± 0,67	7,53 ± 0,49a
CONTROLE	12,75 ± 1,32	7,77 ± 0,68	5,30 ± 0,50b

a vs b, na coluna, diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste "t".

CL = Média ( $\pm$  erro padrão) de corpos lúteos

ER = Média ( $\pm$  erro padrão) de embriões recuperados

ET = Média ( $\pm$  erro padrão) de embriões transferíveis

Da mesma forma, os resultados da resposta ovariana obtidos no presente trabalho não confirmam os relatados prévios de um eventual efeito benéfico (RAJAMAHENDRAN *et al.*, 1987; WARE *et al.*, 1987; TOUATI *et al.*, 1989, 1991) ou deletério (LUSSIER e CARRUTHERS, 1989; GRASSO *et al.*, 1989; GUILBAULT *et al.*, 1990) do "priming" com FSH sobre a produção de embriões, porém, parecem concordar com os achados de RIEGER *et al.* (1988) e GRAY *et al.* (1992) em que o "priming" com FSH não alterou o padrão normal de superovulação em comparação ao grupo que não recebeu o "priming". Por outro lado, a diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no número de embriões transferíveis do grupo 2 com relação ao controle, observada no presente experimento, pode ser puramente casual considerando a subjetividade da avaliação morfológica dos embriões. Esse resultado é de difícil explicação pois ainda não está suficientemente explicado o papel do LH no processo de recrutamento de folículos pre-antrais (GONG e WEBB, 1996). Em folículos antrais, quantidades elevadas de LH têm sido relacionadas com qualidade comprometida dos oócitos, devido à ativação precoce da maturação oocitária (GREVE *et al.* 1995), com a conseqüente perda da capacidade fecundante ou problemas no posterior desenvolvimento. Ainda, considerando que a taxa de embriões recuperados/embriões transferíveis ( $80,9 \pm 0,32$ ;  $80,5 \pm 0,31$ ;  $72,8 \pm 0,32$ ) foi semelhante ( $P > 0,05$ ) para os 3 grupos, torna-se necessário um

maior número de repetições para confirmar definitivamente o efeito benéfico do "priming" com FSH adicionado de LH sobre a qualidade dos embriões produzidos.

## CONCLUSÃO

A administração de pequenas quantidades de FSH puro ou parcialmente contaminado com LH (relação 1:1) nos dias 3 e 4 do ciclo não aumenta a taxa de ovulação nem o número de embriões recuperados após um tratamento de superovulação. Entretanto, foi mostrada uma melhora na qualidade dos embriões dos animais tratados com FSH parcialmente contaminado com LH, o qual deverá ser comprovado com um maior número de repetições.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. K. Touati da Faculté de Médecine Vétérinaire Chaire d'Obstétrique et des Troubles de la Reproduction, Liège, Bélgica pela doação do pré-tratamento de FSH puro que viabilizou a realização deste experimento e aos funcionários de apoio à pesquisa científica e tecnológica Valdomiro Chinaqui e Maria Araci M. do Prado pela colaboração nos trabalhos de campo e laboratoriais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H., FEITOSA, A.S.L. Transferência de embriões ovinos em condições de campo. Bol. Industr. anim., Nova Odessa, v. 48, n. 1, p. 7-11, 1991.
- ALVAREZ, R.H., FEITOSA, A.S.L. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. Zootecnia, Nova Odessa, vol. 32 (ún.), p. 3-10, 1994.
- BOLAND, M. P. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. Theriogenology, Woburn, v. 35, p. 5-17, 1991.
- DOBSON, H. Plasma gonadotrophins and oestradiol during oestrus in the cow. J. Reprod. Fertil., Cambridge, v. 52, p. 51-53, 1978.
- GONG, J. G. , WEBB, R. Control of ovarian follicle development in domestic ruminants : Its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance. Anim. Breed. Abst., v. 3, n. 64, p. 195-204, 1966.
- GONG, J. G. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. J. Reprod. Fertil., Cambridge, v. 97, p. 247-254, 1993.
- GOULDING, D. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. Theriogenology, Woburn, v. 34, n. 4, p. 767-778, 1990.
- GRASSO, F. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-p at the beginning of the estrous cycle. Theriogenology, Woburn, v. 31, n. 6, p. 1209-1220, 1989.
- GRAY, B. W. The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. Theriogenology, Woburn, v. 37, p. 631-639, 1992.
- GREVE, T. The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. Theriogenology, Woburn, v. 43, n. 41-50, 1995.
- GUAY, P., BEDOYA, M. A study of the equivalence between rectal palpation, laparoscopy, laparotomy and ovarian dissection for evaluation of the ovarian response of PMSG - superovulated cows. Can. Vet. J., Ottawa, v. 22, p. 353-355, 1981.
- GUILBAULT, L. A. Relationships between FSH, estradiol and follicular dynamics in superovulated heifers pretreated or not with FSH-p at beginning of the estrous cycle. J. Anim. Sci., Albany, v. 68, n. 1, p. 221, 1990.
- HARVEY, W. R. User's Guide for LSMLMW and MIXMDL - PC - 2 version: mixed model least - squares and maximum likelihood computer program. Ohio : Ohio State University Press, 1990. 90 p.
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERQUE AGRONOMIC - UNCEIA. Blastographie du developpment precoce de l'embryon bovin superovulé. Élevage & Insemination, Paris, v. 178, p. 1-27, 1980.
- LERNER, S. P. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci., Albany, v. 63, p. 176-183, 1986.
- LUSSIER, J. G., CARRUTHERS, T. D. Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid. Theriogenology, Woburn, v. 31, n. 4, p. 779-794, 1989.
- MONNIAUX, D. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology, Woburn, v. 19, n. 1, p. 55-81, 1983.
- RAJAMAHENDRAN, R.. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in holstein cows. Theriogenology, Woburn, v. 28, n. 1, p. 59-65, 1987.
- RIEGER, D. Ovulatory response and embryo yield in superovulated holstein heifers given a priming dose of FSH-p at day 2 of the estrous cycle. Theriogenology, Woburn, v. 30, n. 4, p. 695-699, 1988.
- TOUATI, K. Effect d'une préstimulation ovarienne en début de cycle sur la réponse au traitement de superovulation chez la vache. Ann. Med. Vet., Bruxelles, v. 133, p. 609-612, 1989.
- TOUATI, K. Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. Theriogenology, Woburn, v. 35, n. 1, 1991.
- WARE, C. B. Effects of administration of FSH at the beginning of the cycle on the subsequent response to superovulation treatment in heifers. Theriogenology, Woburn, v. 27, p. 292, 1987.