

## CONTROLE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PMSG PARA FINS DE SUPEROVULAÇÃO DE VACAS DOADORAS DE EMBRIÕES<sup>(1)</sup>

RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>(2)</sup>, TEREZINHA APARECIDA MARTINS GOMES DE CASTRO<sup>(2)</sup> e GLAUCIA MARIA BOVI AMBROSANO<sup>(3)</sup>

**RESUMO:** Trinta e quatro vacas holandesas distribuídas em duas propriedades leiteiras foram superovuladas, entre o oitavo e o décimo segundo dias do ciclo estral, com 2500 UI de PMSG (Gonadotrofina sérica de égua prenhe) (n = 21) ou com 32 mg de FSH-P (Hormônio folículo estimulante-hipofisiário) (n = 13) ministrado em doses decrescentes. Quarenta e oito horas após, aplicou-se uma injeção luteolítica de cloprostenol. A inseminação artificial (IA) foi realizada no início e no final do cio. No momento da primeira IA, dez dos animais superovulados com PMSG receberam 2 ml de anti-soro anti-PMSG ovino. A resposta ovariana foi avaliada no sétimo dia após a IA considerando a presença de corpos lúteos, folículos e o número e qualidade de embriões recuperados após lavagem dos cornos uterinos. Não foi encontrada diferença significativa entre tratamentos para as variáveis número de corpos lúteos, número de folículos e número de embriões recuperados. A porcentagem de embriões viáveis do tratamento anti-PMSG (68,9%) foi semelhante à do tratamento FSH-P (81,5%) e maior (P < 0,05) que do tratamento sem anti-PMSG (24,6%).

**Termos para indexação:** PMSG, anti-PMSG, superovulação, embrião, bovinos leiteiros.

### *The control of biological activity of PMSG in superovulated embryo donors cows*

**SUMMARY:** Thirty four Friesian cows located in two properties were superovulated between 8 and 12 days after the oestrus by injecting 2500 UI of PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) (n = 21) or 32 mg FSH-P (Folicle Stimulant Hormone Pituitary) (n = 13) in decreasing doses. Fourty eight hours later a luteolytic injection of cloprostenol was given. The cows were inseminated by artificial insemination (AI) at the begining and at the end of the oestrus. At the time of the first AI, ten cows treated with PMSG were given 2 ml anti-PMSG ovine antiserum. The ovarian response was evaluated day 7 (day 0 = AI) by counting the number of corpora lutea, follicles and the number and quality of the embryos collected nonsurgically. It was not observed significant difference in the number of corpora lutea, follicles and in the number of embryos, but the percentage of transferable embryos was

(1) Projeto IZ 14-028/87. Recebido para publicação em dezembro de 1989.

(2) Seção de Reprodução e Inseminação Artificial. Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.

(3) Seção de Estatística e Técnica Experimental. Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.



similar for the anti-PMSG (68.9%) and FSH-P (81.5%) treatments, both greater ( $P < 0.05$ ) than the treatment without the anti-PMSG (24,6).

Index terms: PMSG, anti-PMSG, superovulation, embryo, dairy cow.

## INTRODUÇÃO

Apesar dos progressos recentes das técnicas de micromanipulação, que permitem a obtenção de dois ou mais indivíduos a partir de um único embrião (OZIL, 1983), o método mais utilizado para a produção de embriões bovinos continua a ser o estímulo ovariano das fêmeas doadoras. Este consiste em levar a um estágio pré-ovulatório o maior número possível de folículos, quer aqueles cujo desenvolvimento foi acelerado, quer aqueles cuja degeneração (atresia) tenha sido impedida. Isso é possível pela administração de substâncias gonadotróficas que possuam atividade folículo-estimulante (FSH).

Para fins de superovulação, três hormônios são comumente utilizados:

1) FSH hipofisiário parcialmente purificado, caracterizado por possuir uma meia-vida curta, de aproximadamente duas horas (AKBAR *et al.*, 1974), razão pela qual apresenta pouca variabilidade individual, número pequeno de folículos anovulatórios e uma produção média de seis embriões por coleta (GREVE, 1982; CHUPIN & PROCUREUR, 1983). Por outro lado, esse hormônio é de custo elevado e seu uso requer uma série de injeções aplicadas duas vezes ao dia durante quatro ou cinco dias.

2) O HMG (Human Menopausal Gonadotrophin) hormônio extraído da urina de mulher na menopausa, possui propriedades e oferece resultados similares aos obtidos com FSH (ALVAREZ *et al.*, 1987).

3) PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), extraído do soro da égua prenhe, é um hormônio classicamente utilizado em medicina veterinária para tratar problemas de anestro e para provocar superovulação em vacas doadoras de embriões. Embora o custo moderado e a simplicidade de utilização (uma única injeção é suficiente para estimular os ovários) incentivem seu uso, o número imprevisível de ovulações e a variabilidade da resposta ovariana são problemas comumente atribuídos ao PMSG. Dessa forma, certas fêmeas não respondem ao tratamento enquanto que outras mostram um estímulo excessivo com um grande número de folículos anovulatórios. Isso pode ser atribuído à longa meia-vida do PMSG, pois quatro dias após a injeção, ainda existe no sangue 50% da atividade FSH inicialmente injetada (SCHAMS *et al.*, 1978).

Segundo BOOTH *et al.*, (1975), este PMSG circulante após o cio provoca o crescimento de folículos, os quais secretam quantidades consideráveis de

estradiol, perturbando o equilíbrio endócrino durante a subida dos espermatozoides e no momento do transporte dos zigotes através do oviduto.

Diversos autores (DHONDT *et al.*, 1978; KUMMER *et al.*, 1978; SAUMANDE *et al.*, 1984; NIBART *et al.*, 1988) têm constatado que a injeção de uma dose adequada de anti-soro anti-PMSG, durante o cio ou após o pico de LH, suprime todo estímulo pós-ovulatório da secreção de estradiol, entretanto, não ficou claramente estabelecido o aumento da qualidade dos embriões recuperados. O presente experimento tem como objetivo avaliar a eficácia do antisoro anti-PMSG para aumentar o número e a qualidade de embriões bovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de anti-PMSG

Dois ovelhas de 6 meses de idade foram imunizadas com injeções intradérmicas de 2500 UI de PMSG (Folligon, Lab. Intervet- México) associado a 2 ml de adjuvante completo de Freund's (Lab. Sigma-USA), aplicadas a cada quinze dias. A partir da quarta inoculação, as ovelhas foram sangradas por punção da veia jugular e, após sedimentação dos eritrócitos, o soro foi recuperado e estocado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Determinação quali-quantitativa da atividade inibitória do anti-PMSG

A determinação quali-quantitativa da atividade inibidora do antisoro foi medida *in vitro* e *in vivo*. A presença de anticorpos anti-PMSG foi determinada pelo teste de imunodifusão, colocando 5 UI de PMSG como antígeno central contra três diluições de antisoro (10, 20 e 40 ul) e um branco como testemunha. A determinação da quantidade neutralizante do antisoro foi baseado no teste da inibição da hemaglutinação utilizado para diagnóstico de gestação na égua, modificado por ALVAREZ (1985).

O método *in vivo* constitui em avaliar o aumento de peso dos ovários de ratas Wistar impúberes com idade média de  $29 \pm 2$  dias, sacrificadas 48 horas após serem tratadas com 20 UI de PMSG (grupo 1), 20 UI de PMSG + 7, 14 e 28 ul de antisoro incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. (grupos 2, 3 e 4, respectivamente) e 0,4 ml de solução fisiológica (grupo 5).

Finalmente, foi comparada a taxa de recuperação de óvulos e embriões de fêmeas camundongo (*Mus musculus*) da linhagem CBA de seis a oito semanas de



idade submetidas a três diferentes tratamentos: 1) superovulação com 10 UI de PMSG (n=10); 2) superovulação com 10 UI de PMSG + 15 ul de anti-PMSG previamente incubada durante 30 minutos (n=10) e 3) injeção de 10 ul de solução salina (n=10).

Quarenta e oito horas após o início dos tratamentos, os animais receberam uma injeção de 10 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana (Pregnil, Lab. Organon-Brasil) e foram acasalados na proporção de duas fêmeas por macho. Quatro dias depois, os animais foram sacrificados para recuperação dos óvulos e embriões pela lavagem dos ovidutos e cornos uterinos utilizando uma solução tampão fosfatada (PBS) de pH 7,2 (WHITTINGHAM, 1971).

#### Avaliação do anti-PMSG na produção e qualidade de embriões bovinos

**Animais:** Utilizou-se um total de trinta e quatro fêmeas bovinas da raça Holandesa, em diferentes estágios de lactação, distribuídas em duas propriedades leiteiras localizadas no município de Nova Odessa, SP. Os animais da propriedade A (n=18) caracterizaram-se por receber alimentação e manejo adequado enquanto que aqueles da propriedade B (n=16) foram criados em condições zootécnicas insatisfatórias (mudança do regime alimentar, do sistema de manejo, etc.).

**Tratamentos:** Do oitavo ao décimo segundo dias após um cio de referência, os animais foram superovulados com um dos seguintes tratamentos:

a) Dose única de 2500 UI de PMSG (Equinex, Lab. Ayerst- Canadá) administrado por via intramuscular (n=21).

b) 32 mg de FSH (FSH-P, Lab Schering- USA) administrado duas vezes ao dia (6-6;5-5;3-3 e 2-2 mg) durante quatro dias (n=13)

Dois dias após o início dos tratamentos foram aplicados, pela via intramuscular, 2 ml de cloprostenol (Ciosin, Lab. Cooper-Brasil). A inseminação (IA) foi realizada no início e no final do cio. No momento da primeira IA, dez dos animais superovulados com PMSG receberam, por via endovenosa, 2 ml do anti-soro anti-PMSG.

**Coleta de embriões:** A lavagem uterina e recuperação dos embriões foram realizadas no sétimo dia após a IA, segundo metodologia descrita por ALVAREZ (1985).

**Resposta Ovariana aos Tratamentos de Superovulação:** Avaliou-se a resposta ovariana pela palpação retal, por ecografia e pela observação direta dos ovários após sacrifício de alguns animais. Foi considerado o tamanho dos ovários e o número de estruturas (corpos lúteos e folículos) presentes após a coleta. Igualmente, foram analisados o número total

de embriões recuperados e a qualidade dos mesmos pelo exame morfológico e pelo desenvolvimento após transferência em fêmeas receptoras.

**Análise estatística:** A resposta ovariana aos diferentes tratamentos foi submetida a análise de variância (Teste F), segundo delineamento inteiramente ao acaso. Quando significativa, as médias entre tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5%. O teste de  $\chi^2$  foi empregado para comparação da qualidade dos embriões.

Para efeito de análise de variância os dados de contagem foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de anti-PMSG

O teste de imunodifusão evidenciou a presença de anticorpos anti-PMSG no soro de uma das ovelhas a partir da sexta inoculação. A eficácia inibitória do anti-PMSG pelo método de inibição da hemaglutinação mostrou que 1 ml de anti-soro é suficiente para neutralizar 2500 UI de PMSG.

Esta atividade biológica foi confirmada *in vivo* considerando o grau de estímulo ovariano de ratas impúberes tratadas com 20 UI de PMSG previamente incubadas com diferentes concentrações de anti-soro (7, 14 e 28 ul) (quadro 1).

Quadro 1. Peso dos ovários de ratas impúberes tratadas com PMSG ou PMSG + Anti-PMSG

Nº de animais	Tratamentos	Peso dos ovários $\bar{x} \pm d.p.$ (mg)
5	20 UI PMSG	58,1 $\pm$ 11,9
5	20 UI PMSG + 7 ul Anti-PMSG	26,6 $\pm$ 17,4b
5	20 UI PMSG + 14 ul Anti-PMSG	28,5 $\pm$ 13,1b
5	20 UI PMSG + 28 ul Anti-PMSG	25,0 $\pm$ 6,5b
5	Solução salina	22,8 $\pm$ 8,4b

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O peso médio dos ovários dos animais tratados com qualquer uma das diluições do anti-PMSG foi semelhante ( $P > 0,05$ ) aos tratados com solução salina ( $\bar{x} = 22,8\text{mg}$ ) e significativamente diferente do peso médio dos ovários do grupo controle (58,1 mg) que recebeu unicamente o PMSG ( $P < 0,05$ ).

O número médio de estruturas (óvulos e embriões) recuperadas nos camundongos tratados com PMSG ( $\bar{x} = 32,2$ ) foi significativamente superior ( $P < 0,5$ ) à média encontrada para os tratamentos com anti-PMSG ( $\bar{x} = 16,6$ ) ou solução salina ( $\bar{x} = 15,6$ ), os dois últimos não mostrando diferença entre si (quadro 2).



**Quadro 2. Efeito do anti-PMSG na produção de embriões *Mus musculus***

Nº de animais	Tratamentos	Embriões recuperados (x ± d.p.)
5	10 UI PMSG	32,2 ± 6,5 a*
5	10 UI PMSG + 15 ul Anti-PMSG	16,6 ± 3,1 b
5	Solução salina	15,6 ± 5,4 b

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Outros autores têm mostrado que a superovulação com PMSG pode ser igualmente impedida em ratas, cabras e novilhas, utilizando anti-soros, anti-PMSG, heterólogos produzidos em cabras e bovinos (SAUMANDE & CHUPIN, 1981 e ARMSTRONG *et al.*, 1982).

### Efeito do anti-PMSG em bovinos

Dos trinta e quatro animais tratados, 31 (91,2%) responderam aos tratamentos de superovulação apresentando três ou mais corpos lúteos (quadro 3). Resultados similares foram relatados por DIELEMAN *et al.* (1989), na espécie *Bos taurus* e por ALVAREZ *et al.* (1987), na espécie *Bos indicus*.

**Quadro 3. Resposta ovariana após diferentes tratamentos de superovulação**

Tratamentos	Nº de animais	Boa resposta (%)*
PMSG	11	10 (90,9)
PMSG + Anti-PMSG	10	8 (80,0)
FSH	13	13 (100,0)

\* Animais com +2 corpos lúteos.

O fato de que todos os animais da propriedade A responderam com 3 ou mais corpos lúteos enquanto que três animais da propriedade B tratados com PMSG não apresentaram boa resposta, sugere um possível efeito das condições de manejo, entretanto, trabalhos realizados com vacas bem alimentadas e que não responderam ao estímulo gonadotrófico faz pensar no envolvimento de um fator genético ligado à fertilidade (BINDON *et al.*, 1986).

No total, foram notados 229 corpos lúteos e 30 folículos à palpação retal nos animais que responderam aos tratamentos (média de 7,4 corpos lúteos e 1,10 folículos por animal). Não foi observada diferença entre tratamentos nem entre animais das propriedades A e B (quadro 4).

A observação direta dos ovários após o sacrifício de alguns animais permitiu conferir a concordância na avaliação das estruturas ovarianas por ecografia (figura 1) e por palpação retal.

A precisão de avaliação correta das estruturas

ovarianas por palpação retal foi satisfatória como o indica o exame por ultrassom (quadro 5).

**Quadro 4. Média de corpos lúteos e folículos notados por palpação retal dos animais das propriedades A e B**

Propriedade	Tratamento	n*	Corpos lúteos	Folículos
A	PMSG	5	8,0 ± 1,6 a	1,4 ± 0,9
	PMSG + Anti-PMSG	5	7,4 ± 1,2 a	1,0 ± 0,4
	FSH	8	7,6 ± 1,0 a	0,4 ± 0,2
	Total	18	7,7 ± 0,7	0,8 ± 0,2
B	PMSG	5	7,6 ± 1,4a	1,2 ± 1,8
	PMSG + Anti-PMSG	3	7,0 ± 2,1a	0,7 ± 0,7
	FSH	5	6,4 ± 0,7 a	1,2 ± 1,8
	Total	13	7,0 ± 1,2	1,1 ± 0,4
A + B	PMSG	10	7,8 ± 1,2a	1,3 ± 0,4
	PMSG + Anti-PMSG	8	7,2 ± 0,7a	0,9 ± 0,3
	FSH	13	7,1 ± 0,4a	1,0 ± 0,4
	Total	31	7,4 ± 0,6	1,1 ± 0,2

\* n = número de animais

\*\* Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si ao nível 5%, pelo teste de Tukey

**Quadro 5. Média de corpos lúteos determinados através da palpação retal e da ecografia**

Tratamentos	Palpação retal x ± dp	Ecografia x ± dp
PMSG	8,0 ± 1,6a*	7,8 ± 0,8a
PMSG + anti-PMSG	7,4 ± 1,2a	7,6 ± 1,0a
FSH	7,6 ± 1,0a	7,4 ± 0,8a

\* Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

A maioria dos animais tratados com PMSG, mostra um aumento excessivo do tamanho dos ovários, além da presença de grandes folículos císticos (figura 2). Por sua vez, os animais tratados com anti-PMSG e FSH embora também apresentassem folículos de tamanhos diferentes, a resposta foi mais uniforme (figura 3).

Do total de animais que apresentaram boa resposta, foram recuperados 180 embriões (média de recuperação de 5,8 embriões/animal), correspondendo a uma taxa de recuperação de 78,6%. Não foi observada diferença entre tratamentos (quadro 6). Embora tenham sido relatados trabalhos conflitantes quanto à obtenção do maior número de embriões com FSH (ELSDEN *et al.*, 1978) ou PMSG (YADAV *et al.*, 1986), a maioria dos autores (DHONDT *et al.*, 1978; KUMMER *et al.*, 1980; GREVE, 1982; SAUMANDE *et al.*, 1984; DIELEMAN *et al.*, 1989) não encontraram diferença no número total de embriões recuperados com um ou outro tratamento.



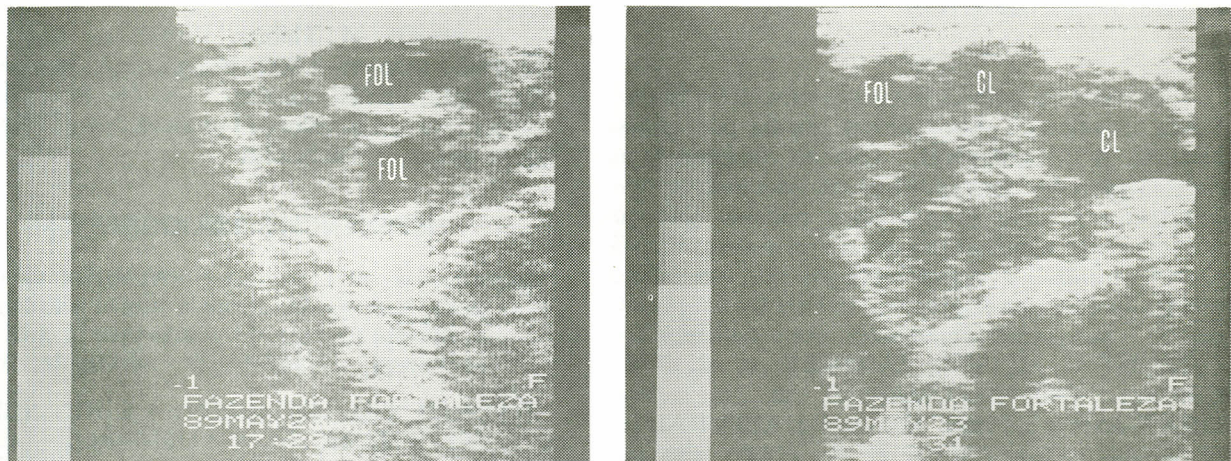


Figura 1. Corpos lúteos e folículos diferenciados por ecografia. Ovário superovulado com FSH-P.



Figura 2. Exemplo de folículo anovulatório (ov. esquerdo) provocados por um tratamento de superovulação com PMSG.

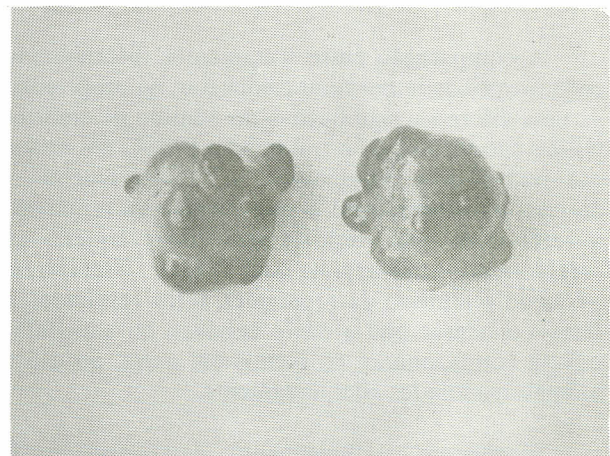


Figura 3. Exemplo de resposta ovariana ao tratamento de superovulação com FSH-P.



- CHUPIN, D. & PROCUREUR, R. Aspects techniques de la transplantation embryonnaire. B. Tec. insemin. artif., Paris, 29: 1-8, 1983.
- DHONDT, D.; BOUTERS, R.; SPINCEMAILLE, J.; CORYN, M. & VANDEPLASSCHE, M. The control of superovulation in the bovine with a PMSG antiserum. Theriogenology, Los Altos, Calif., 9:529-34, 1978.
- DIELEMAN, S.E.; REVERS, M.M.; WURTH, Y.A.; GIELEN, J.T. & WILLEMSE, A.H. Improved embryo yield and condition of donors ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. Theriogenology, Los Altos, Calif., 31(2):473-87, 1989.
- ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D. & SEIDEL Jr., G.E. Superovulatory cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. Theriogenology, Los Altos, Calif., 9:17-26, 1978.
- GREVE, T. Embryo transplantation in dairy cattle: an attempt to analyze factors that may affect embryo number and quality. Congress International Sur Le Transfert d'embryons chez les mamiferes, 2., Annecy, septembre, 1982. Proceedings ... Annecy, International Embryo Transfer Society, 1982. p. 251-76.
- KUMMER, V.; ZRALY, Z.; HOLCAK, V.; VEZNIK, Z.; SCHLEGELOVA, J. & HRSCA, K. Superovulation in cattle; effect of goat anti-PMSG serum. Theriogenology, Los Altos, Calif., 14:383-90, 1980.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Superovulation in cattle; effect of injection of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. Theriogenology, Los Altos, Calif., 20:727-31, 1984.
- NIBART, M.; SLIMANE, N.; HERRERA, R.H.; JEAN-GUYOT, N.; MECHEKOUR, F.; HUMBLLOT, P. & THIBIER, M. Variations des concentrations plasmatiques des hormones gonadotropes (FSH, LH) et steroïdes (oestradiol 17 $\beta$ , progesterone) après différents traitements de superovulation chez la vache. Elev. Insem., Paris, (226):11-30, 1988.
- OZIL, J.P. Production of identical twins by bisection of blastocyst in the cow. J. Reprod. Fert., Cambridge, 69, 463-8, 1983.
- SAUMANDE, J. & CHUPIN, D. Production of PMSG antiserum in cattle; assay of inhibitory activity and use in superovulated heifers. Theriogenology, Los Altos, Calif., 15(1):108, 1981.
- \_\_\_\_\_; PROCUREUR, R. & CHUPIN, D. Effect of injection of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. Theriogenology, Los Altos, Calif., 21:727-31, 1984.
- SCHAMS, D.; MENSER, C.; SCHALLEMBERGER, F.; HOFFMAN, B.; HAHN, J. & HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: SREENAN J.M., ed. Current topics in veterinary medicine. The Hague, Nijhoff, 1978. p. 1222-43.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature, London, 233 (5315): 125-6, 1971.
- YADAV, M.C.; WALTON, J.S. & SEIDEL Jr., J.E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. Theriogenology, Los Altos, Calif., 9:17-26, 1986.