



INDUÇÃO DA SUPEROVULAÇÃO DE VACAS NELORE PASSIVAMENTE IMUNIZADAS CONTRA LÍQUIDO FOLICULAR BOVINO¹

RAFAEL HERRERA ALVAREZ², LIA DE ALENCAR COELHO³ e CYRO FERREIRA MEIRELLES⁴

RESUMO: O presente estudo objetivou avaliar a resposta ovariana de vacas Nelore superovuladas com dose reduzida de FSH após imunização passiva contra líquido folicular bovino. Em um ensaio de reversão, 18 vacas Nelore receberam os seguintes tratamentos: injeção intravenosa de 80 ml de anti-líquido folicular bovino produzido em ovelhas castradas (tratamento 1) ou soro ovino não imune (tratamentos 2 e 3). Seis horas após, os animais receberam 200 (tratamentos 1 e 2) ou 400 (tratamento 3) UI de FSH-LH (Pluset, Lab. Serono) administradas em doses decrescentes durante 4 dias. No terceiro dia, os animais receberam uma dose luteolítica de cloprostenol (Veteglan, Lab. Serono) e foram inseminados no cio induzido. A resposta ovariana foi avaliada entre os dias 6 e 8 após a inseminação pela discriminação dos corpos lúteos (CL) utilizando ultra-sonografia e pelo número de embriões recuperados após lavagem dos cornos uterinos utilizando o método cervical convencional. A taxa de animais que responderam com mais de 3 CL ao tratamento de superovulação foi maior ($P < 0,05$) nos tratamentos 1 (94,4%) e 3 (83,3%) que no tratamento 2 (50,0%). Igualmente, o número médio de embriões recuperados foi maior ($P < 0,05$) nos tratamentos 1 ($4,1 \pm 0,9$) e 3 ($5,2 \pm 0,9$) que no tratamento 2 ($2,1 \pm 0,5$). Em função desses resultados pode-se concluir que, em vacas Nelore, a imunização passiva contra líquido folicular aumenta a sensibilidade dos ovários ao tratamento com gonadotrofinas exógenas.

Termos para indexação: Superovulação, líquido folicular, imunização passiva, bovinos, transferência de embriões.

OVARIAN RESPONSE OF NELORE COWS SUPEROVULATED WITH FSH AFTER PASSIVE IMMUNIZATION AGAINST BOVINE FOLLICULAR FLUID

SUMMARY - The aim of the present study was to evaluate the ovarian response of cows superovulated with reduced dose of FSH following passive immunization against bovine follicular fluid. Eighteen Nelore cows were used in a cross over design with the following treatments: iv injection of 80 ml of ovine anti-bovine follicular fluid (treatment 1) or ovine non immune serum (treatment 2 and 3). Six h later, cows were superovulated with 200 (treatment 1 and 2) or 400 UI (treatment 3) FSH-LH hormone (Pluset, Lab. Serono) administered in decreasing doses during 4 days. On the third day, the animals received a luteolytic dose of cloprostenol (Veteglan, Lab. Serono) and were inseminated on the induced estrus. The ovarian response was evaluated 6 to 8 days after insemination by counting the corpora lutea (CL) with ultrasound scanning and by evaluation of the embryos recovered using standard techniques of cervical embryo collect. The rate of good response to superovulation ($>3CL$) of the treatments 1 (94.4%) and 3 (83.3%) was higher and statistically

¹ Projeto IZ-014-024/96 financiado pela FAPESP (Proc.95/4295-5)

² Centro de Genética e Reprodução - Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP

³ Departamento de Zootecnia-FZEA/USP, Pirassununga, SP

⁴ Departamento de Ciência Animal -CENA-USP, Piracicaba, SP



different ($P < 0.05$) from treatment 2 (50.0%). Likewise, the mean number of embryos recovered from treatments 1 (4.1 ± 0.9) and 3 (5.2 ± 0.9) was higher and statistically different ($P < 0.05$) from treatment 2 (2.1 ± 0.5). From these results, it can be concluded that passive immunization against bovine follicular fluid increase the ovarian sensitivity to exogenous gonadotropin in Nelore cows.

Index terms: Superovulation, follicular fluid, passive immunization, bovine, embryo transfer.

INTRODUÇÃO

A grande variabilidade da resposta ovariana aos tratamentos convencionais de superovulação constitui o principal obstáculo para um melhor aproveitamento da tecnologia da transferência de embriões na espécie bovina. Essa dificuldade faz com que não seja possível prever o número de embriões que serão recuperados de uma determinada doadora submetida ao processo de superovulação. Os fatores responsáveis por essa variabilidade são de origem múltipla e ainda pouco compreendidos (GREVE, 1982 e ALVAREZ, 1994).

Recentemente, entretanto, informações baseadas nos resultados de produção de embriões de animais superovulados na ausência (GUILBAULT et al., 1991; HUNHTINEN et al., 1992; LUSSIER et al., 1995) ou após a eliminação (BUNGARTZ e NIEMANN, 1994) do folículo dominante, sugerem que é possível resolver, ou ao menos diminuir, o problema da variabilidade da resposta ao tratamento de superovulação. Um inconveniente de aplicar essas técnicas deriva da necessidade de acompanhar diariamente a dinâmica de crescimento folicular, o que implica o uso de equipamentos relativamente caros (ultra-som e acessórios específicos) nem sempre disponíveis, bem como uma boa habilidade do técnico para realizar a punção do folículo dominante.

Outra via para eliminar o efeito negativo da dominância folicular seria a neutralização imunológica de substâncias específicas presentes no líquido folicular as quais atuam como moduladoras da ação das gonadotrofinas hipofisárias (FINDLAY, 1993). Dessa forma, a imunização ativa contra inibina ou peptídeos derivados, provoca um aumento na taxa de ovulação (HILLARD et al., 1994; TAKEDOMI et al., 1995; MORRIS et al., 1997). Dois problemas podem ser limitantes ao uso dessa via: 1) o custo relativamente caro do imunógeno (inibina) e 2) o uso da imunização ativa provoca uma resposta não controlada durante

longos períodos de tempo. Uma alternativa que pode ser considerada é usar como imunógeno o líquido folicular bovino livre de esteróides (LFb), o qual tem se mostrado eficiente para aumentar a taxa de ovulação em 30% dos animais imunizados (ALVAREZ et al., 1996). A aplicação direta de anticorpos anti-LFb (imunização passiva) oferece a vantagem de exercer a inibição durante um curto período de tempo, voltando em seguida às condições normais. Assim, considerando que a imunização passiva contra LFb sensibiliza o ovário a ação do FSH endógeno, pode-se considerar a hipótese de que a imunização contra LFb aumente o número de animais com boa resposta ao tratamento de superovulação. Adicionalmente, a aplicação de doses reduzidas de FSH exógeno seriam suficientes para provocar superovulação nos animais imunizados. Dessa forma, é objetivo do presente trabalho avaliar a resposta ovariana de vacas Nelore superovuladas com dose normal ou reduzida de FSH após imunização passiva contra líquido folicular bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito vacas Nelore de diferentes idades e paridade, mantidas em condições uniformes de manejo e consideradas clinicamente aptas para a reprodução foram submetidas a um ensaio com reversão ("change-over design") dos seguintes tratamentos: injeção intravenosa de 80 ml de anti-líquido folicular bovino produzido em ovelhas castradas conforme metodologia de ALVAREZ et al. (1997) (tratamento 1) ou soro ovino não imune (tratamentos 2 e 3). Seis horas após, os animais receberam 200 (tratamentos 1 e 2) ou 400 (tratamento 3) UI de FSH-LH (Pluset, Lab. Serono) administradas em doses decrescentes durante 4 dias. No terceiro dia, os animais receberam uma dose luteolítica de cloprostenol (Veteglan, Lab. Serono) e foram inseminados no cio induzido. A resposta ovariana foi avaliada entre os dias 6 e 8 após a inseminação pela discriminação dos corpos lúteos (CL) utilizando ultra-



sonografia (Ultra-som Pie Medical 200 Vet) e pelo número de embriões recuperados após lavagem dos cornos uterinos utilizando o método cervical convencional (ALVAREZ et al., 1995). Adicionalmente, amostras de sangue foram coletadas da veia jugular (tubos vacutainer B&D com heparina) de todos os animais no início dos tratamentos, no momento da inseminação e no momento da coleta de embriões. Após centrifugação (10 minutos) e recuperação do plasma, as amostras foram estocadas congeladas (-20 °C) até dosagem da progesterona pelo método de radioimunoensaio (ALVAREZ et al., 1991).

Os dados foram analisados utilizando a versão 6.0 do software Statistica. As diferenças entre os tratamentos no número de folículos, taxa de ovulação, viáveis foram analisadas por ANOVA. As diferenças entre tratamentos no número de animais com fraca resposta (<3 CL) foram analisadas pelo teste de Qui quadrado. Medidas de associação linear entre as concentrações de progesterona plasmática e a resposta ovariana foram determinadas por análise de correlação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra a sensibilidade ovariana dos animais aos diferentes tratamentos de superovulação. A taxa de resposta (presença de ≥ 3 corpos lúteos) do tratamento Ac-FSH-50 (94,4%) foi significativamente superior ($P < 0,05$) ao tratamento FSH-50 (50,0%) e não foi estatisticamente diferente do tratamento FSH-100 (83,3%).

Quadro 1. Sensibilidade ovariana de vacas imunizadas com anti-LFb tratadas com 200 UI de FSH-LH(Ac-FSH-50) e de vacas não imunizadas tratadas com 200 (FSH-50) ou 400(fsh-100)UI de FSH-LH

Resposta ovariana	Tratamentos		
	Ac-FSH-50	FSH-50	FSH-100
≥ 3 Corpos lúteos	17a	9b	15a
<3 Corpos lúteos	1	9	3

χ^2 a vs b = $P < 0,05$

Esse resultado é relevante e parece confirmar os resultados observados previamente por nossa equipe, utilizando um número menor de repetições (ALVAREZ et al., 1996). Assim, o anti LFb pode ter contribuído para tornar mais sensíveis os folículos à ação

estimulante das gonadotrofinas exógenas. É importante salientar que o animal imunizado que não respondeu ao tratamento de superovulação foi igualmente insensível nos outros tratamentos. Por outro lado, a falta de resposta de dois animais do tratamento FSH-100 e um do tratamento FSH-50 pode ser explicada pelas baixas concentrações de progesterona ($< 3,18$ nmol/L) no início do tratamento de superovulação. Dessa forma, o motivo mais provável que explique a falta de resposta ao tratamento foi uma inadequada observação do cio prévio à superovulação.

O Quadro 2 ilustra os resultados quantitativos da resposta ovariana de todos os tratamentos.

Quadro 2. Resposta ovariana de animais imunizados com anti-LFb tratados com 200UI de FSH-LH (Ac-FSH-50) e não imunizados tratados com 200 (FSH-50) ou 400 (FSH-100) UI de FSH-LH

Resposta ovariana	Tratamentos		
	Ac-FSH-50	FSH-50	FSH-100
Nº de animais	18	18	18
Corpos lúteos	8,1 \pm 0,8a	4,2 \pm 0,8b	9,2 \pm 1,4 ^a
Folículos	2,3 \pm 0,6a	1,3 \pm 0,5 ^a	1,5 \pm 0,5 ^a
Embriões recuperados	4,1 \pm 0,9a	2,1 \pm 0,5b	5,2 \pm 0,9 ^a
Embriões viáveis	3,6 \pm 0,9a	1,8 \pm 0,5b	3,6 \pm 0,8a

a vs b, nas linhas = $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

A análise dos dados mostrou que o tratamento Ac-FSH-50 permitiu uma produção de embriões comparável à obtida com o tratamento FSH-100 e significativamente maior ($P < 0,05$) que o tratamento FSH-50.

A presença de um grande folículo (≥ 10 mm) no momento da superovulação não foi um fator condicionante da resposta aos tratamentos de superovulação. Vale mencionar, contudo, que o crescimento folicular não foi acompanhado diariamente, de forma que o folículo observado poderia estar em regressão. Trabalhos prévios de nossa equipe mostraram, com efeito, que nem sempre o maior folículo corresponde ao folículo dominante (ALVAREZ et al., 1995). Um dado interessante a ser mencionado foi a maior sensibilidade ao tratamento de superovulação dos animais que apresentaram vários folículos de tamanho médio (entre 3 e 6 mm) no início da superovulação. Essa observação foi particularmente válida para os animais do tratamento FSH-50 que



responderam bem ao tratamento de superovulação. Se confirmado, esse dado poderá ser um critério a mais para ser considerado na escolha das doadoras antes do início da superovulação. Nesse sentido, cabe mencionar os trabalhos de GONG et al. (1993 e 1996) e CARVALHO et al. (1998) direcionados a aumentar o número de folículos de tamanho intermediário no início da superovulação, pela aplicação de hormônio do crescimento bovino. Com essa metodologia foi possível aumentar significativamente a resposta ovariana em termos de número de embriões recuperados.

Cabe mencionar que a administração intravenosa do anti-LFb ovino provocou em 5 animais (28%) sintomas acentuados de hipersensibilidade tipo 1 (tosse, dispnéa e sialorréia). Esses animais, incluindo uma vaca que foi medicada com Sulfato de Atropina, recuperaram-se espontaneamente, após alguns minutos. Outros 5 animais dos tratamentos controle apresentaram os mesmos sintomas quando receberam o placebo (soro ovino). Não ficou estabelecido, portanto, um possível efeito negativo da anafilaxia provocada pelo uso de soro heterólogo sobre a produção ou qualidade dos embriões.

As concentrações de progesterona plasmática dos animais que responderam e os que não responderam ao tratamento de superovulação não foram significativamente diferentes nos 3 tratamentos. A Figura 1 mostra as concentrações de progesterona no início da superovulação, no momento da IA e no dia da coleta de embriões.

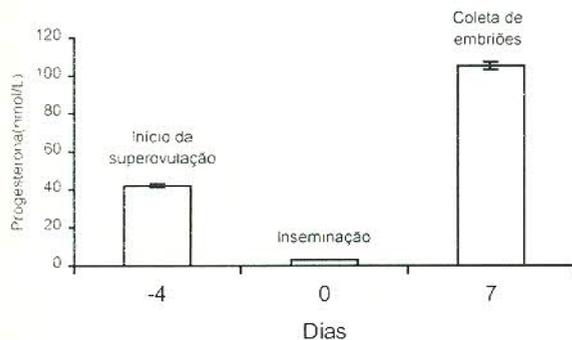
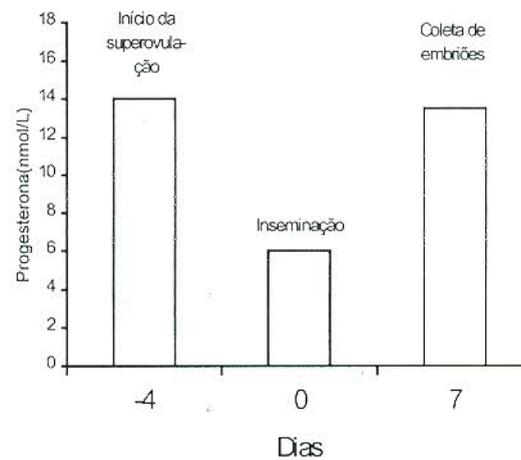


Figura 1. Concentrações de progesterona plasmática (média \pm erro padrão) em três períodos diferentes do processo de superovulação de vacas que responderam com ≥ 3 corpos lúteos. Foram excluídos da análise os animais que apresentaram concentrações de progesterona $< 3,18$ nmol/L no início da superovulação (3 vacas) e $> 3,18$ nmol/L no momento da inseminação (6 vacas).

A dosagem de progesterona no início dos tratamentos permitiu evidenciar 3 animais inadequados, do ponto de vista fisiológico, para serem submetidos ao processo de superovulação. As concentrações de progesterona inferiores a 3,18 nmol/L são indicativas que os animais encontravam-se próximos ao período ovulatório (no estro ou metaestro), entretanto, nenhuma manifestação de comportamento estral foi observada. A Figura 2 apresenta um exemplo do comportamento hormonal das vacas nessa situação.

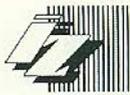
Quando considerados os animais que apresentaram níveis de progesterona adequados no início dos tratamentos (superiores a 3,18 nmol/L) não foi observada correlação significativa entre essas concentrações e a posterior resposta ovulatória. Consequentemente, conforme sugerido por ALVAREZ et al. (1996) na espécie *Bos taurus*, a dosagem de progesterona não pode ser considerada como critério de seleção de vacas doadoras de embriões

Figura 2. Concentrações de progesterona plasmática



reduzidas no início da superovulação de vacas do grupo FSH-50 que responderam com < 3 corpos lúteos e não foi recuperado nenhum embrião.

Por sua vez, as concentrações de progesterona no dia da coleta de embriões foram significativamente correlacionadas ($r=0,7$, $P<0,05$) com o número de corpos lúteos mas não com o número de embriões recuperados. Essa discrepância deve-se ao fato da taxa de recuperação de embriões não coincidir com o número de corpos lúteos, conforme mostrado recentemente por ALVAREZ et al. (1997). Ainda, em seis animais (dois de cada tratamento) foi observada luteólise parcial (concentrações de progesterona entre 4 e 6 nmol/L) no



momento da inseminação. Essa condição não afetou a resposta ovariana (moderada ou boa), entretanto, exceto em um animal do tratamento FSH-100 (Figura 3), os embriões recuperados mostraram-se degenerados ou não fecundados.

Esses resultados sugerem que concentrações relativamente elevadas de progesterona não necessariamente inibem a ovulação ou a fecundação, mas afetam a qualidade dos embriões, provavelmente durante sua passagem no oviduto, conforme foi sugerido por BOOTH et al. (1975).

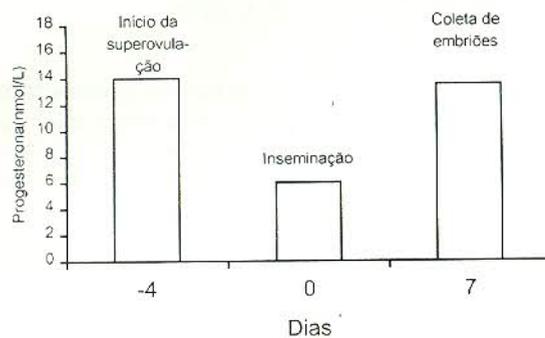


Figura 3. Luteólise incompleta no momento da inseminação de vaca do grupo controle (FSH-100) que apresentou moderada resposta ao tratamento de superovulação (4 corpos lúteos). Foram recuperados 3 embriões de boa qualidade.

CONCLUSÃO

Em função dos resultados observados pode-se concluir que, em vacas Nelore, a imunização passiva contra líquido folicular bovino aumenta a sensibilidade dos ovários ao tratamento com gonadotrofinas exógenas. Consequentemente, dependendo do valor comercial do anti-LFb, os custos podem ser reduzidos devido a uma menor necessidade de hormônio FSH exógeno para provocar superovulação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao funcionário de apoio à pesquisa Sebastião Frizone, e ao Técnico Agropecuário Vanderlei Vaugis, bolsista da FAPESP, pela sua colaboração competente e entusiasta nas diferentes etapas do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. *Zootecnia*, Nova Odessa, v. 32 (ún.), p. 3-10, 1994.
- _____ et al. The use of lower doses of the prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 25, n.1, p. 93-96, 1991.
- _____ et al. Resposta ovariana de vacas Mantiqueira superovuladas na presença ou ausência de um folículo morfologicamente dominante. *Rev. bras. Reprod. anim.*, Belo Horizonte, v.19, n.3-4, p.187-192, 1995.
- _____ et al. Gonadotrophin profiles and ovulation rate of cows passively immunized against bovine follicular fluid. *INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION*, 13., Sidney, Australia, 1996. *Proceedings...* Sidney: 1996. v. 2.
- _____ et al. Produção de anticorpos contra líquido folicular de origem zebuina nas espécies *Bos taurus taurus* e *Ovis aries*. *B. Industr. anim.*, Nova Odessa, v.54, n.1, p.33-38, 1997.
- BOOTH, W.D. et al. Plasma estrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. *Vet. Rec.*, London, v. 8, n.5, 366-369, 1975.
- BUNGARTZ, L., NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v. 101, p. 583-591, 1994.
- CARVALHO, J.B.P. et al. Priming com somatotrofina bovina na resposta ovariana de vacas superovuladas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.*, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 236, 1998.
- FINDLAY, J.K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, Champaign, v.48, n.1, p. 15-23, 1993.
- GONG, J. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.*, Champaign, v.48, n.3, p.1141-1147, 1993.



- _____ et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhance the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, Los Altos, v.45, n.6, p. 611-622, 1996.
- GREVE, T. Embryo transplantation in dairy cattle. An attempt to analyze factors than may affect embryo number and quality. In:INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, Anecy,1982. *Proceedings...* Anecy: 1982. p. 251-256.
- GUILBAULT, L.A. et al. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.,Caambridge*, v. 91, n.1, p.81-89, 1991.
- HILLARD, M.A. et al. Inhibin vaccines for increased ovulation rate and fecundity in cattle. In: MEETING AUSTRALIAN SOCIETY ANIMAL PRODUCTION, Western Australia, 1994. *Proceedings...* Western Australia: 1994. v. 20. p. 27-28.
- HUNHTINEN, M. et al. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, Los Altos, v.37, n.3 , p.457-463, 1992.
- LUSSIER, J.G. et al. Effects of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology*, Los Altos, v. 43, p. 270, 1995. (abstracts)
- MORRIS, D.G. et al. Effects of peptide to carrier ratio on the immune and ovarian response to inhibin immunization in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.48, n.1, p.1-8, 1997.
- TAKEDOMI, T. et al. Effects of passive immunization against bovine inhibin on ovulation rate and circulating FSH levels in Holstein heifers. *Theriogenology*, Los Altos, v.43, n.1, p.333, 1995 (abstract).