

## INDUÇÃO DO CIO E LUTEÓLISE EM NOVILHAS TRATADAS COM UMA MINI-DOSE DE CLOPROSTENOL ADMINISTRADA PELA VIA INTRAMUSCULAR OU INTRAVULVO-SUBMUCOSA (1)

*(Oestrus induction and luteolysis in heifers treated with a cloprostenol mini-dosis through intramuscular or intravulvo-submucosal administration)*

RAFAEL HERRERA ALVAREZ (2), CYRO FERREIRA MEIRELLES (3), JOSÉ VICTOR DE OLIVEIRA (2), JULIANA RODRIGUES POZZI (2) e FERNANDO GOMES DE CASTRO JUNIOR (4)

**RESUMO:** Para avaliar a resposta estral e luteolítica à minidose de cloprostenol aplicada pela via intramuscular (i.m.) ou intravulvosubmucosa (i.v.s.m.), vinte e oito novilhas mestiças receberam entre os dias 7 a 14 após o cio, os seguintes tratamentos com sete repetições cada: tratamento A) 500 µg cloprostenol (i.m.), tratamento B) 125 µg cloprostenol (i.m.), tratamento C) 125 µg cloprostenol (i.v.s.m.) e tratamento D) testemunha, 2 ml de solução salina (i.m.). A média dos níveis de progesterona plasmática (P4) minutos antes do início do tratamento foi de 4,94, 4,71, 5,76 e 3,48 ng/ml para os tratamentos A, B, C, e D respectivamente, não apresentando diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Após vinte e quatro horas, observou-se uma queda nos valores médios de P4 dos tratamentos A (0,91 ng/ml), B (1,17 ng/ml) e C (1,72 ng/ml) mas não do D (4,37 ng/ml) ( $P < 0,01$ ). Todas as novilhas do tratamento A, três do tratamento B, cinco do tratamento C e nenhuma do tratamento D, manifestaram cio nos cinco dias posteriores ao início dos tratamentos ( $P < 0,01$ ). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos B e C para este critério. Esse resultados sugerem que a minidose de cloprostenol pode provocar um efeito farmacológico semelhante, independente da via de aplicação i.m. ou i.v.s.m.

Termos para indexação: cio, luteólise, cloprostenol, intravulvosubmucosa, novilhas.

### INTRODUÇÃO

A atividade luteolítica da prostaglandina  $F2 \alpha$  (PGF2  $\alpha$ ) nos bovinos, evidenciada inicialmente por ROWSON et alii (1972), despertou o interesse dos profissionais ligados à reprodução, como um recurso potencial para controlar o ciclo estral desta e de outras espécies de interesse zootécnico.

Entretanto, o custo relativamente elevado da dose convencional do tratamento aplicado pela via intramuscular (i.m.), constitui um fator limitante do uso intensivo desta substância. Em razão disso, diversas pesquisas tem sido conduzidas visando reduzir a dose luteolítica da PGF2  $\alpha$  ou seus análogos

(1) Parte do Projeto IZ-14.027/88. Recebido para publicação em março de 1989.

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

(3) Departamento de Zoologia, da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

(4) Da Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.

sintéticos administrados por vias diferentes à muscular. Assim, TERVIT et alii (1973) e INSKEEP (1973), mostraram que doses reduzidas de PGF2  $\alpha$  aplicadas pela via intrauterina provocam o cio e luteólise em bovinos apresentando um corpo lúteo funcional. Porém, devido à dificuldade de aplicação e os riscos de contaminação bacteriana do útero, este método não foi satisfatório.

PETTERS (1984) encontrou efeito luteolítico da mini-dose de análogo de PGF2  $\alpha$  liberada lentamente pela via subcutânea mas requer o uso de uma mini-bomba osmótica, sendo inviável para aplicação prática. Finalmente ONO

et alii (1982), observaram que a injeção de uma dose reduzida de PGF2  $\alpha$  aplicada na mucosa vulvar provoca luteólise e cio fértil em animais com corpo lúteo persistente.

Resultados similares têm sido reportados por outros autores utilizando fêmeas com atividade ovariana normal (HORTA et alii, 1986) ou subnormal (CHAUHAN et alii, 1986). Entretanto, esses dados podem ser questionados pela falta de um grupo testemunha tratado pela via i.m. com doses reduzidas de PGF2  $\alpha$ . Este estudo visa testar a eficácia luteolítica e comportamental da minidose de cloprostenol aplicada pela via i.m. em novilhas com atividade ovariana normal.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e oito novilhas mestiças de 3 a 4 anos de idade, em boas condições nutricionais e ciclando regularmente, receberam entre os dias 7 e 14 posteriores ao cio, um dos seguintes tratamentos com sete repetições cada:

Tratamento A: 500  $\mu$ g de Cloprostenol (i.m.)

Tratamento B: 125  $\mu$ g de Cloprostenol (i.m.)

Tratamento C: 125  $\mu$ g de Cloprostenol (i.v.s.m.)

Tratamento D: 2 ml de solução salina (i.m.)

Um exame por palpação retal no início do tratamento permitiu detectar a presença de um corpo lúteo em todos os animais utilizados.

A resposta comportamental face aos tratamentos foi avaliada pela observação, três vezes por dia, das manifestações estrais características (aceitação da monta, inflamação da vulva e secreção de muco cervical), enquanto que a resposta luteolítica foi medida pela evolução diária dos níveis de progesterona plasmática (P4) durante cinco dias a partir do início dos tratamentos.

O tempo consumido no processo da coleta do sangue da veia jugular em tubos Vacutainer Heparinizados de 20 ml (B & D), centrifugação (2500 rpm), recuperação e estocagem do plasma a -20°C, foi inferior a 90 minutos. A dosagem de progesterona pelo método de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando-se como traçador o <sup>125</sup>I foi realizada no laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, ESALQ seguindo o método convencional (INTERNATIONAL AGENCY OF ATOMIC ENERGY (1984).

Os dados referentes à manifestação do cio e luteólise em resposta aos diferentes tratamentos foram submetidos ao teste de Fisher, segundo GOMES (1978). Os dados com relação ao teor de P4 foram analisados seguindo um delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo em que as parcelas eram representadas pelas doses e vias de aplicação do cloprostenol (GOMES, 1978). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias dos níveis de P4 entre os tratamentos e finalmente, a regressão polinomial permitiu nos seguir a evolução da P4 em função do tempo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de plasma de um animal pertencente ao tratamento D permaneceram descongeladas durante vários dias, tornando-as inviáveis para análise por RIA, ficando esse tratamento com seis repetições.

Nas análises radio-imunológicas, a precisão inter e entre ensaios foi de 7,5% e 11,5% respectivamente.

A análise dos níveis de P4 no início dos tratamentos mostrou que todos os animais utilizados neste experimento encontravam-se em fase luteínica apresentando níveis de P4 que variavam entre 2,6 e 8,4 ng/ml, com uma média  $\pm$  e.p de  $4,8 \pm 0,3$  ng/ml, sendo portanto

susceptíveis à ação luteolítica do cloprostenol. Vinte e quatro horas após a injeção do cloprostenol, observou-se uma queda nos valores médios de P4 a níveis próximos de 1 ng/ml ( $1,3 \pm 0,2$  ng/ml).

Não foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos A ( $\bar{x} = 0,9 \pm 0,2$ ), B ( $\bar{x} = 1,2 \pm 0,3$ ) e C ( $\bar{x} = 1,7 \pm 0,6$ ). Por sua vez, os níveis médios de P4 dos animais do tratamento D ( $\bar{x} = 4,6 \pm 0,8$ ) mostraram-se significativamente superiores em relação aos outros tratamentos ( $P < 0,01$ ). Esta tendência permaneceu inalterada nos três dias subsequentes (quadro 1).

Quadro 1. Comparação entre tratamentos dos níveis médios ( $\pm$  e.p.) de P4 (ng/ml.) e depois da aplicação de cloprostenol ou solução salina.

Dose de cloprostenol ( $\mu$ g)	n	Tempo (horas)				
		0	24	48	72	96
500 (i.m.)	7	$4,94 \pm 0,55$ a	$0,91 \pm 0,22$ b	$0,37 \pm 0,04$ b	$0,36 \pm 0,04$ b	$0,42 \pm 0,08$ b
125 (i.m.)	7	$4,71 \pm 0,73$ a	$1,17 \pm 0,32$ b	$0,93 \pm 0,23$ b	$1,68 \pm 1,68$ b	$1,67 \pm 0,67$ b
125 (i.m.v.s.)	7	$5,76 \pm 0,39$ a	$1,72 \pm 0,56$ b	$1,17 \pm 0,61$ b	$1,12 \pm 0,50$ b	$0,91 \pm 0,36$ b
Sol. salina	6	$3,48 \pm 0,51$ a	$4,37 \pm 0,83$ a	$4,91 \pm 0,86$ a	$4,59 \pm 0,72$ a	$6,27 \pm 1,34$ a

- Médias seguidas das mesmas letras (vertical), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A equação da regressão ilustra de maneira geral a evolução do teor de P4 em função do tempo para os diversos tratamentos (figura 1). Quando a evolução de P4 é analisada individualmente dentro de cada tratamento, observou-se que todos os animais do tratamento A apresentaram níveis inferiores a 1 ng/ml quarenta e oito horas após a aplicação do cloprostenol; três animais do tratamento B evidenciaram uma luteólise incompleta caracterizada por uma queda inicial que nunca atingiu 1ng/ml, seguida por uma elevação

posterior e finalmente, um animal do tratamento C, o qual, à semelhança de todos aqueles do tratamento D, apresentou níveis elevados de P4 durante todo o período de estudo (figura 2).

Esta luteólise parcial observada em alguns indivíduos também foi relatada por ONO et alii (1982) e CHAHUAN et alii (1982) em vacas e búfalas tratadas com doses reduzidas de PGF2  $\alpha$  pela via i.v.s.m. ou intrauterina respectivamente.

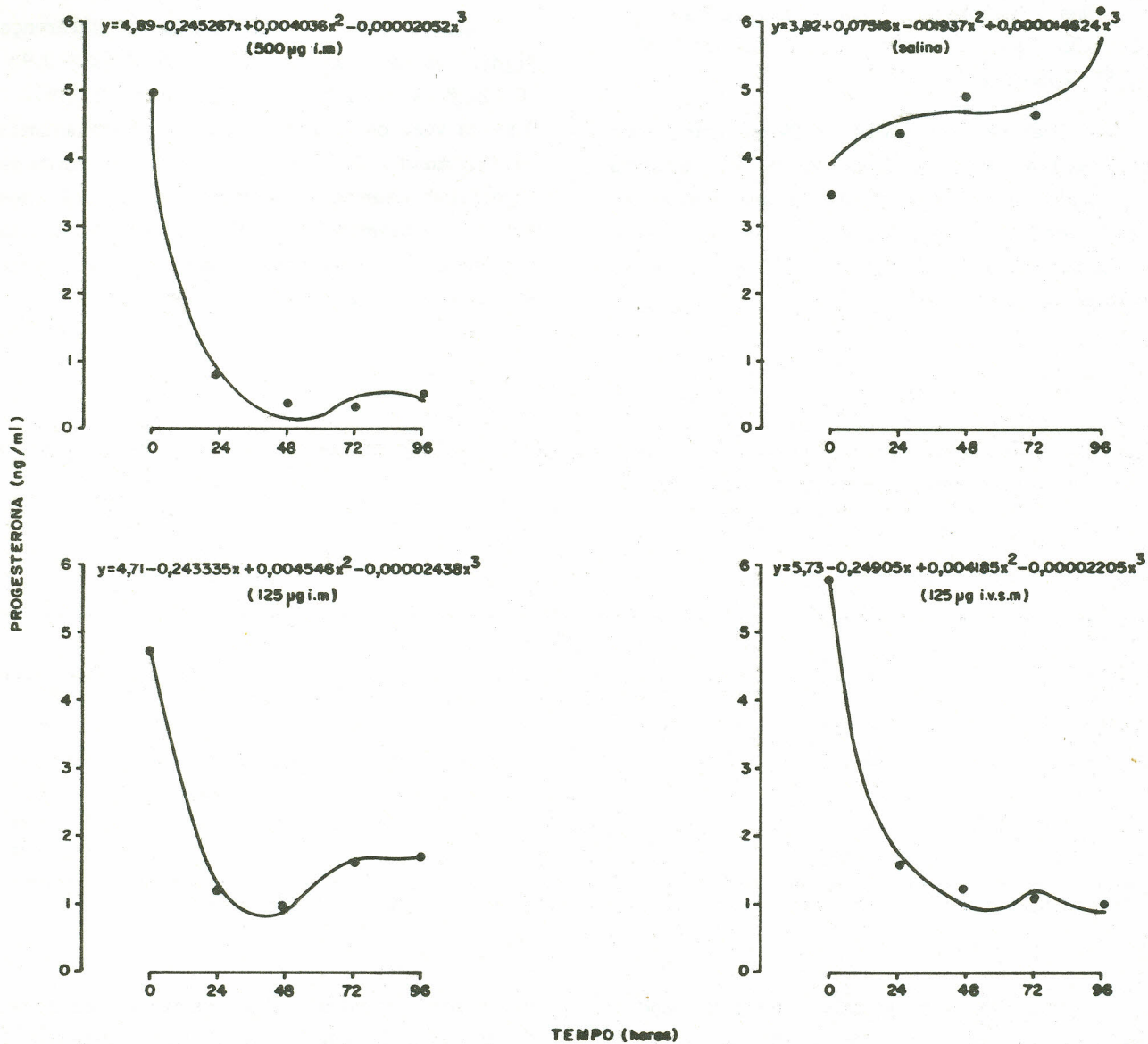


Figura 1. Regressão polinomial mostrando a evolução dos níveis de progesterona plasmática em função do tempo dentro de cada tratamento.

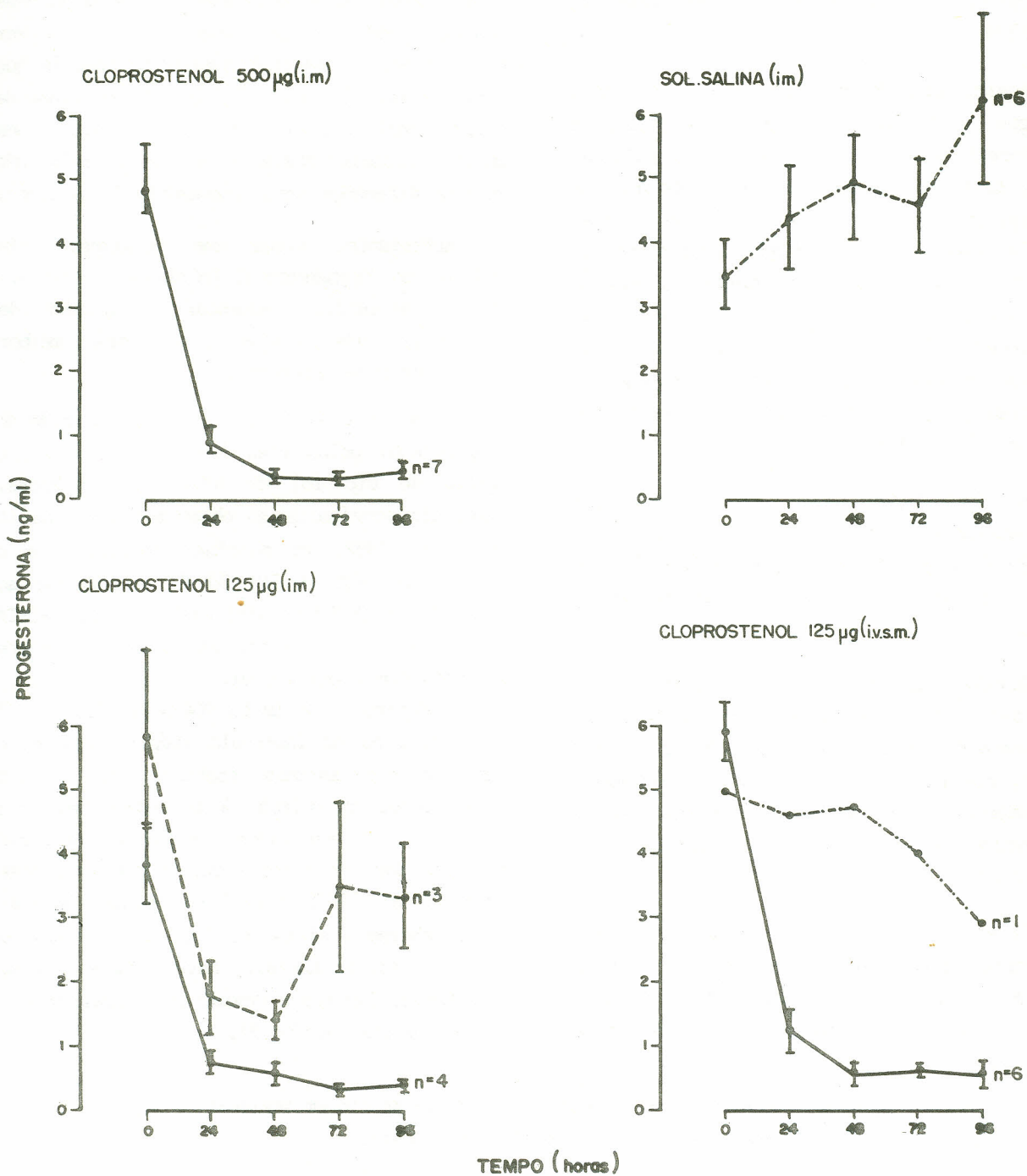


Figura 2. Evidência da luteólise completa (—), parcial (---) e não-luteólise (-.-) após aplicação de diferentes tratamentos de cloprostenol em novilhas apresentando um corpo lúteo funcional ( $\bar{X} \pm ep$ ).

Estes resultados levantam a hipótese desses animais possuírem uma menor sensibilidade à ação luteolítica da mini-dose de PGF2  $\alpha$

Assim, considerando que a PGF2  $\alpha$  e seus análogos sintéticos possuem uma meia-vida extremamente curta no plasma sanguíneo (HANZEN, 1983), tanto em nossos resultados como nos dos autores precedentes, esta luteólise parcial estaria associada à quantidade insuficiente de PGF2  $\alpha$  exógena independentemente da via de administração, pois ainda é necessário esclarecer se a injeção de PGF2  $\alpha$  pela via i.v.s.m. provoca um efeito local sem penetrar na circulação sistêmica, como foi sugerido por HORTA et alii (1986).

A porcentagem total de animais que manifestaram cio nos cinco dias posteriores à injeção do cloprostenol foi de 71,4% e 0,0% do grupo controle que recebeu o placebo ( $P < 0,01$ ).

Quando comparados os tratamentos, observa-se uma diferença significativa do tratamento A (100%) em relação ao B (42,8%) e D (0,0%), enquanto o C (71,4%) difere unicamente do tratamento D ( $P < 0,05$ ). Por sua vez, o tratamento B não se mostrou diferente do C e D (quadro 2).

Estes resultados confirmam outros previamente relatados por ONO et alii (1982); CHAUHAN et alii (1986) e DALLA PORTA et alii (1987), os quais mostram uma eficácia

comparável para induzir o cio em vacas leiteiras ou de corte utilizando a dose convencional ou a mini-dose de PGF2  $\alpha$  ou seus análogos administrados pela via i.v.s.m. Por outro lado, o reduzido número de animais que manifestaram cio após a injeção da mini-dose de cloprostenol pela via i.m., parece sugerir uma menor eficácia deste tratamento, pois não mostrou diferença com o tratamento D (placebo).

Entretanto, visto que igualmente não diferiu do tratamento C (mini-dose i.v.s.m.) faz-se necessário aumentar o número de repetições nos tratamentos, para melhor esclarecer essa diferença.

O intervalo médio entre a administração do cloprostenol pelas vias i.m. ou i.v.s.m. e o início do cio foi de  $63,4 \pm 19,1$  horas, intervalo semelhante ao observado por LEAL et alii (1982) em novilhas tratadas com o análogo de PGF2  $\alpha$  ICI 80996, e inferior ao relatado por HORTA et alii (1986) e DALLA PORTA et alii (1987), em vacas leiteiras ou de corte tratadas com cloprostenol.

À diferença de DALLA PORTA et alii (1987) que encontrou um intervalo significativamente superior nos animais tratados com a dose convencional em relação à mini-dose pela via i.v.s.m., nos resultados indicam um intervalo superior para os animais que receberam a dose convencional (72,6 horas) em relação àqueles que receberam a mini-dose i.m. (52,0 horas) ou i.v.s.m. (57,6 horas). Estes dados ficam, entretanto, limitados devido ao pequeno número de observações (quadro 2).

Quadro 2. Efeito dos tratamentos na indução do cio em novilhas apresentando um corpo lúteo funcional.

Tratamento	n	Novilhas em cio (%)	Intervalo médio do cloprostenol/cio (h)
A (500 $\mu$ g, i.m.)	7	7 (100%) a	$72,6 \pm 18,8$
B (125 $\mu$ g, i.m.)	7	3 (42,8%) b	52,0
C (125 $\mu$ g, i.m.v.)	7	5 (71,4%) ab	$57,6 \pm 21,5$
D (sol. salina)	6	0 (0,0%) cb	-

- a x b x c ( $P < 0,05$ )

A taxa de concordância entre níveis de P4 inferiores a 1 ng/ml e a manifestação de cio nos 5 dias posteriores à injeção de cloprostenol, foi de 100% para o tratamento A, 75% para o tratamento B e 80% para o tratamento C ( $P < 0,05$ ). Dois animais dos tratamentos B e C não manifestaram cio apesar de possuírem baixos níveis de P4.

O oposto foi observado em um animal do tratamento C o qual apresentou cio com níveis de P4 superiores a 1 ng/ml (quadro 3). Resultados similares foram observados por CHAUHAN et alii (1986) em vacas leiteiras mostrando que baixos níveis de P4 nem sempre são necessários para exteriorizar o cio.

Quadro 3. Relação de animais que manifestaram cio na presença de níveis baixos ( $< 1$  ng/ml) ou elevados ( $> 1$  ng/ml) de P4 nos cinco dias posteriores à injeção de cloprostenol.

Dose de cloprostenol	n	níveis de P4 $< 1$ ng/ml	manif. cio (%)	níveis de P4 $> 1$ ng/ml	manif. cio (%)
500 (i.m.)	7	7	7(100%)	0	-
125 (i.m.)	7	4	3(75%)	3	0 (0%)
125 (i.m.v.s.)	7	5	4(80%)	2	1 (50%)
sol. salina	6	0	0(100%)	6	0 (0%)

### CONCLUSÃO

Pelos resultados aqui observados pode-se concluir que uma mini-dose de cloprostenol administrada pela via i.m. ou i.v.s.m. causa

luteólise e indução do cio em novilhas ciclando regularmente.

**SUMMARY:** In order to evaluate the oestral and luteolytic response to intramuscular (i.m.) or intravulvo-submucous (i.v.s.m.) cloprostenol mini-dosis injection, twenty eight crossbred heifers received 7 to 14 days after oestrus, one of following treatments with seven replications each: A) 500  $\mu$ g (i.m.) cloprostenol; B) 125  $\mu$ g (i.m.) cloprostenol; C) 125  $\mu$ g (i.v.s.m.) cloprostenol and D) 2 ml saline solution (i.m.). Mean progesterone concentration (P4) in blood plasma just before the application of the treatments was 4.94, 4.71, 5.76 and 3.48 ng/ml respectively for treatments A, B, C and D, without any significant difference ( $P > 0.05$ ). Twenty four hours later, there was a fall in the mean progesterone concentration of treatments A (0.91 ng/ml), B (1.17 ng/ml), C (1.72 ng/ml) but not of the treatment D (4.37) ( $P < 0.01$ ). All heifers of treatment A, three of treatment B, five of treatment C and none of treatment D were observed in oestrus during a five days period after the beginning of the treatments ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between treatments B and C. This results suggest that a cloprostenol mini-dosis when administered by i.m. or i.v.s.m. routes do not cause a different pharmacological effect.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAUHAN, F. S.; SHARMA, R. D. & SINGH, G. B. Responses of different doses of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on estrus induction, fertility and progesterone levels in subestrus buffaloes. Theriogenology, Los Altos, Calif., 17:247-53, 1982.
- ; MGONGO, F. O. K.; KESSY, B. M. & GOMBE, S. Effects of intravulvo-submucosal cloprostenol injections on hormonal profiles and fertility in subestrus cattle. Theriogenology, Los Altos, Calif., 26:69-75, 1986.
- DALLA PORTA, M. A.; RESTILE, J. & GARCIA, G. G. Ação luteolítica de diferentes doses de prostaglandina em vacas de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24., Brasília, DF, 1987. Anais... de 26 a 31 de julho. Brasília, DF, 1987. p. 346.
- GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 8. ed. Piracicaba, SP, Nobel, 1978. 430 p.
- HANZEN, C. Les prostaglandines; biosynthese et phramacologie. Ann. Med. Vet., Bruxellas, 127:409-33, 1983.
- HORTA, A. E. M.; COSTA, C. M. S. G.; ROBALO SILVA, J. & RIOS VASQUES, M. I. Possibility of reducing the luteolytic dose of cloprostenol in cyclic dairy cows. Theriogenology, Los Altos. Calif., 25:291-301, 1986.
- INSKEEP, E. K. Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. J. Anim. Sci., Albany, N.Y., 36 1149-57, 1973
- INTERNATIONAL AGENCY OF ATOMIC ENERGY. Laboratory training manual on radioimmuassay in animal reproduction. s.l.p. 1984. 269p. (Technical Reports Series, 233)
- LEAL, J. A.; EGGLETON, C. M. J.; DEREZ, F.; CARVALHO, M. R.; BRUSCHI, J. H. & VILAS NOVAS, J. C. Efeito da aplicação do ICI 80996 em diferentes fases do ciclo estral sobre a sincronização do cio em novilhas. Pesq. Agropec. Bras., Rio de Janeiro, 17:497-501, 1982.
- ONO, H.; FUKUI, Y.; TERAWAKI, Y.; OHBOSHI, K. & YAMASAKI, I. D. An intravulvo-submucosa injection of prostaglandin F<sub>2</sub> in anoestrus cows. Anim. Reprod. Sci., Amsterdam, 5:1-5, 1982.
- PETERS, A. R. Luteolysis in cows using the prostaglandin F<sub>2</sub> analogue tiaprost, and the effect of mode of administration. Vet. Rec., London, 114(17):418-21, 1984
- ROWSON, L. E. A.; TERVIT, R. & BRAND, A. The use of prostaglandins for. synchronization of oestrus in cattle. J. Reprod. Fertil., Oxford, 29:145, 1972.
- TERVIT, R.; ROWSON, L. E. A. & BRAND, R. Synchronization of oestrus in cattle using a prostaglandin F<sub>2</sub> alpha analogue (ICI 79937). J. Reprod. Fertil., Oxford, 34:179-81, 1973.