

## RESPOSTA OVARIANA DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) SUPEROVULADAS COM PMSG OU FSH-P<sup>(1)</sup> SU-

RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>(2)</sup>, JOSÉ RAMOS NOGUEIRA<sup>(2)</sup> e ARLINDO MARIANO ARAUJO FILHO<sup>(3)</sup>

**RESUMO:** Trinta búfalas mediterrâneas foram submetidas ao processo de superovulação utilizando hormônio folículo estimulante de origem hipofisiário (FSH-P) ou gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG). A dosagem utilizada foi de 36 mg de FSH-P (n = 15) e de 2500 U.I. de PMSG (n = 15). Apenas 40% dos animais responderam aos tratamentos de superovulação com mais de 2 corpos lúteos. O número de boas respostas foi maior no tratamento com PMSG (53,3%) em relação ao tratamento FSH-P (26,6%) (P < 0,01). O fator comum de ambos os tratamentos foi a grande variabilidade na resposta ovariana e a baixa taxa de recuperação de embriões em relação ao número de corpos lúteos determinados *in situ* e por palpação retal. No total, foram recuperados pela via não cirúrgica, oito embriões de cinco animais que apresentaram boa resposta e quatro embriões de três animais que apresentaram um ou dois corpos lúteos.

**Termos para indexação :** superovulação, PMSG, FSH, búfalo.

### *Ovarian response of buffaloes (*Bubalus bubalis*) superovulated with PMSG or FSH-P*

**SUMMARY:** Thirty mediterranean buffaloes were subjected to superovulation using follicle-stimulating hormone (FSH-P) or pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). The dosage used was 36 mg of FSH-P (n = 15) and 2500 U.I. of PMSG (n = 15). Only 40% of the treated animals responded to the treatments with more than 2 corpus luteum. The rate of positive responses of the treatment PMSG was of 53.3% while the rate of the FSH-P treatment was 26.6% (P < 0.01). The common factor of both treatments was the great variability of ovarian response and the low recovery rate of embryos, considering the number of corpus luteum determined *in situ* and by rectal palpation. Eight embryos were recovered nonsurgically from five animals showing positive response and four embryos from three female with one or two corpus luteum.

**Index terms:** superovulation, PMSG, FSH, water buffaloes.

(1) Projeto IZ 14-029/88. Recebido para publicação em abril de 1990.

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

(3) Divisão Regional Agrícola de Araçatuba. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral.

## INTRODUÇÃO

Para fins práticos, o uso da transferência de embriões (T.E.) fica condicionada, em parte, à disponibilidade de um grande número de embriões de boa qualidade recuperados de uma determinada fêmea doadora. Na maioria das espécies domésticas, isto é conseguido pelo estímulo dos ovários (superovulação) utilizando substâncias com atividade foliculo-estimulante. Embora a indução da superovulação na espécie *Bos taurus* seja um evento estudado há mais de quarenta anos (CASIDA et al., 1943), só recentemente tais experimentos foram realizados na espécie bubalina em países como a Bulgária (KARAIVANOV, 1986, DROST et al., 1988), EUA (DROST et al., 1983 e 1986, DROST & ELSDEN, 1985) e Tailândia (CHANTARAPRATEEP et al., 1988). No Brasil, onde se encontra o maior rebanho bubalino do continente americano, nenhum trabalho tem sido realizado embora exista uma demanda cada vez maior dessa tecnologia para fins práticos ou de pesquisa. Este estudo objetivou quantificar e analisar os fatores que afetam a resposta ovariana de fêmeas bubalinas superovuladas com PMSG ou FSH-P em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e época

O presente experimento foi realizado no período de maio a julho de 1989 no Posto Experimental de Castilho, localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, latitude 20° 47'S, longitude 51° 34'W. O clima local segundo a classificação Köppen é tropical úmido com inverno seco. Temperatura média anual mínima de 17,8 °C e máxima de 29,6 °C.

### Animais

Após constatação da presença de um corpo lúteo por palpação retal, foram selecionadas 30 búfalas da raça Mediterrâneo com idade variando de 6 a 10 anos e pesando em média 690 kg, mantidas sob condições similares de manejo em regime de pasto em capim-colônia (*Panicum maximum*, Jacq.). Todos os animais apresentavam uma ficha reprodutiva normal, com seu último parto ocorrendo de 4 a 6 meses antes do início do experimento, de forma que ainda amamentaram seus bezerros no período experimental.

### Procedimento experimental

Os animais foram sincronizados pela aplicação de duas doses luteolíticas de cloprostenol (Ciosin, do laboratório Coopers) administradas num intervalo de doze dias. Doze a quinze dias após a segunda aplicação, as doadoras foram distribuídas ao acaso em dois grupos de 15 animais cada.

O grupo 1, foi superovulado com injeção única de 2500 U.I. de PMSG (Equinex, laboratório Ayerst, Ca-

nadá) e o grupo 2, recebeu 36 mg de FSH-P (FSH-P, lote 560F86, laboratório Schering, EUA) administrado em doses decrescentes (6-6; 5-5; 4-4 e 3-3 mg) duas vezes ao dia (7:00 e 18:00 horas) durante quatro dias. Quarenta e oito horas após o início dos tratamentos, os animais receberam 2 ml de cloprostenol para induzir o cio. Dois dias após, foi determinada a atividade funcional dos ovários pela dosagem de progesterona no leite (Bovitest, Biotécnica) em algumas fêmeas antes de serem colocadas na presença de diferentes machos de comprovada fertilidade para serem cobertas.

Independentemente da cobertura ou manifestação do cio, foram realizadas coletas de embriões das doadoras pelo método não cirúrgico (ALVAREZ et al., 1987), do sexto ao oitavo dia (dia 0 = presença do macho). A resposta ovariana foi avaliada no dia da coleta considerando o número de corpos lúteos (C.L.) e folículos (fol.) por palpação retal e confirmada *in situ* após o abate de alguns animais dois dias após a coleta.

O teste  $\chi^2$  foi utilizado para comparar as diferenças de resposta ovariana entre tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de doadoras superovuladas, foram detectados 79 corpos lúteos e 34 folículos. A concordância da precisão na avaliação das estruturas ovarianas por palpação retal em relação à observada *in situ* foi de 95%. Isto foi facilitado pela fraca resposta ovariana da maioria dos animais, pois segundo estudos na espécie bovina (MONNIAUX et al., 1983), esta precisão é menor a medida que o número de estruturas aumenta.

O número de estruturas presentes no ovário direito ( $\bar{x} = 1,33$  C.L. e 0,47 fol.), foi similar ao encontrado no ovário esquerdo ( $\bar{x} = 1,30$  C.L. e 0,67 fol.) (quadro 1). O fator comum de ambos os tratamentos foi a grande variabilidade ao estímulo gonadotrófico, pois unicamente 12 (40%) animais apresentaram boa resposta ( $> 2$  C.L.), sendo 8 (53,3%) do tratamento PMSG e 4 (26,6%) do tratamento FSH-P ( $P < 0,01$ ). O alto índice de não-respostas pode ser atribuído ao estado fisiológico inadequado no momento do tratamento, pois este foi iniciado em datas predeterminadas considerando como referência unicamente a segunda aplicação de cloprostenol.

KARAIVANOV (1986) observou, em búfalos murrá, uma taxa de boa resposta inferior a 40% enquanto que DROST et al. (1988), relatam índices elevados (70%) nessa mesma raça. No presente trabalho, a menor taxa de resposta superovulatória com o tratamento FSH-P pode ser atribuída, entre outros, ao próprio hormônio o qual se encontrava no limite de validade no momento da utilização. Resultados de pesquisa na raça Murrá não mostram diferença entre PMSG e FSH (CHANTARAPRATEEP et al., 1988), sendo que inclusive foi observada uma melhor resposta com o tratamento FSH-P (KARAIVANOV, 1986).

Quadro 1. Resposta ovariana individual e número de embriões recuperados de búfalas Mediterrâneo (*Bubalus bubalis*) superovuladas com PMSG ou FSH-P

Fêmea Nº	Ovário direito		Ovário esquerdo		Embriões recuperados
	CL	Fol	CL	Fol	
PMSG (2.500 U.I.)					
38	2	1	3	1	0
329	1	3	1	1-2	0
78	1	2	2	2	0
154	2	0	2	0	2 bons
75	1	1	1-2	2	0
246	1	0	2-3	1	1 degenerado
61	1	0	2	2	0
131	0	0	2	0	2 bons
179	2-3	0	2	0	0
59	0	1	2	0	0
52	0	0	0	0	não coletada
317	1	0	1	1	0
175	2	4	2	4	2 bons
243	5	0	6	0	0
275	0	1	1	0	0
FSH-P (36 Mg)					
175	2-3	0	1	1	0
59	0	0	1	0	0
243	1	0	1	1	1 bom
211	0	0	0	0	não coletada
148	2	0	0	0	0
253	0	0	2	0	1 bom
191	0	0	0	0	não coletada
150	1	0	2	0	1 bom
271	0	0	0	0	não coletada
329	8	1	2	1	0
78	2	0	1	0	2
(bom e degenerado)					
246	1	0	0	0	0
38	2	0	0	1	0
154	1	0	0	1	0
75	1	0	0	1	0

CL: Corpos Lúteos; Fol: Folículos

Nos animais com boa resposta, o número médio de corpos lúteos produzidos com PMSG ( $\bar{x} = 4,62$ ) foi similar ao observado com FSH-P ( $\bar{x} = 4,75$ ). Por sua vez, o número médio de folículos do tratamento PMSG ( $\bar{x} = 2,12$ ) foi maior em relação ao observado no tratamento FSH-P ( $\bar{x} = 0,75$ ) (quadro 2). No total, foram recuperados 12 embriões, oito de cinco animais que

apresentaram boa resposta e quatro de animais com um ou dois corpos lúteos (quadro 3).

Quadro 3. Rendimento da coleta de embriões de búfalas apresentando mais de dois ou menos de três corpos lúteos (CL) após tratamento de superovulação

Resposta ovariana	Número de coletas	Coletas positivas	Embriões recuperados
> 2 CL	12	5	8
< 3 CL	10	3	4

Do ponto de vista prático, esses resultados colocam em questão a conveniência do uso de hormônios para a produção de embriões na espécie bubalina. A análise do quadro 3 indica um rendimento de embriões similar entre os animais que apresentaram boa resposta e aqueles que não responderam ao estímulo gonadotrófico.

A fraca taxa de recuperação nesta espécie tem sido previamente relatada por autores como DROST et al., 1983 e 1988, SHARIFUDDIN & JAINUDEEN, 1984; CHANTARAPRATEEP et al., 1988), os quais relatam a influência de fatores anatômicos (trato genital pequeno), nutricionais e semiológicos. SHARIFUDDIN & JAINUDEEN (1984), por exemplo, não recuperaram nenhum embrião da coleta de sete fêmeas, argumentando como prováveis causas a superestimulação ovariana e a perda de líquido de coleta dentro do útero.

No presente experimento, embora existisse alguma dificuldade em posicionar a sonda de Folley nas primeiras coletas, a operação foi realizada sem problemas tendo-se recuperado praticamente 100% do líquido de retorno uterino.

Considerando que a coleta de embriões foi realizada independentemente da observação do cio e cobertura na maioria dos animais, existe a hipótese de não-ovulação ou dos embriões ficarem retidos no oviduto por causa da ovulação tardia. Essa hipótese ganha consistência pelo fato de mais da metade (58,3%) dos animais apresentarem concentrações elevadas de progesterona no leite quando colocadas na presença do macho, quarenta e oito horas após a injeção do clo-

Quadro 2. Rendimento de coleta de embriões dos animais que apresentaram boa resposta ovariana (>2 C.L.) aos tratamentos de superovulação

Hormônio	Nº de animais		Nº de Estruturas ovarianas ( $\bar{x} \pm dp$ )		Embriões recuperados	
	Super ovulados	Boa resposta	CL	Fol	Bons	Degenerados
PMSG	15	8(53,3%) <sup>a</sup>	37 (4,62 ± 2,67)	17 (2,12 ± 2,75)	4	1
FSH-P	15	4(26,6%) <sup>b</sup>	19 (4,75 ± 3,50)	3 (0,75 ± 0,95)	2	2
Total	30	12(40,0%)	56 (4,67 ± 2,80)	20 (1,67 ± 2,35)	6	3

a: versus b: P < 0,01 pelo teste  $\chi^2$ ; CL: Corpos Lúteos; Fol: Folículos

prostenol (quadro 4).

Quadro 4. Progesterona no leite e manifestação do cio de búfalas superovuladas com PMSG ou FSH

Nº da fêmea	Tratamento	48 h após cloprostenol <sup>(1)</sup>	Sinais do cio	CL <sup>(2)</sup>	Fol	Embriões recup.
59	PMSG	+	não	1	0	0
329	FSH	+	sim	10	2	0
52	PMSG	-	sim	1	0	0
78	FSH	-	sim	3	0	2
317	PMSG	+	sim	2	1	0
175	PMSG	-	sim	4	8	2
243	PMSG	+	não	11	0	0
246	FSH	+	não	1	0	0
38	FSH	+	não	2	1	0
154	FSH	-	sim	1	1	0
75	FSH	-	sim	1	1	0
275	PMSG	+	sim	1	1	0

(1) + : progesterona presente; - : Não progesterona

(2) CL: Corpos Lúteos; Fol: Folículos; recup.: recuperados

Entretanto, deve ser considerado que o teste imunoenzimático utilizado foi desenvolvido para ser aplicado em bovinos e oferece resultados qualitativos, podendo dar margem a erros de interpretação devido ao maior teor de gordura no leite de búfalas. Assim, para melhor esclarecer o verdadeiro status fisiológico nos diferentes processos que antecedem a coleta de embriões, será necessário recorrer a testes quantitativos por métodos radioimunológicos ou imunoenzimáticos de gonadotrofinas hipofisiárias e hormônios esteróides (principalmente progesterona).

Estudos complementares são necessários para esclarecer a baixa taxa de recuperação de embriões naqueles animais que apresentaram boa resposta ovariana.

### CONCLUSÕES

1. O hormônio PMSG foi mais efetivo para provocar superovulação que o hormônio FSH-P.
2. Em função das características comportamentais e reprodutivas específicas da espécie bubalina, não é recomendado implantar um programa de transferência de embriões tomando como modelo a espécie bovina.
3. Estudos complementares são necessários para esclarecer a baixa taxa de recuperação de embriões naqueles animais que apresentaram boa resposta ovariana.

na.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H.; AGUIAR, A.F. & STRANSSBURGER, J. Indução da superovulação com FSH-P ou HMG em gado nelore. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, 11(4):187-92, 1987.
- CASIDA, L.E.; MEYER, R.K.; McSHAW, W.H. & WISNICKY, W. Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and the induction of superovulation in cattle. Amer. J. Vet. Res., Chicago, Ill., 4:76-80, 1943.
- CHANTARAPRATEEP, P.; LOHACHIT, C.; KIBAYASHI, G.; TECHAKUMPHU, M.; VIRAKUL, P.; KUNAVONGKRIT, A. & PRATEEP, P. Ovarian responses to gonadotrophin stimulation in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Buffalo B., Bangkok, 7(4):82-6, 1988.
- DROST, M. & ELSDEN, R.P. Blastocyst development in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology, Los Altos, Calif., 23(1):191, 1985.
- \_\_\_\_\_ ; WRIGHT, J.M.; CRIPE, W.S. & RICHTER, A.R. Embryo transfer in water buffalo. (*Bubalus bubalis*). Theriogenology, Los Altos, Calif., 20(5):579-84, 1983.
- \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; & ELSDEN, R.P. Intergeneric embryo transfer between water buffalo and domestic cattle. Theriogenology, Los Altos, Calif., 25(1):13-23, 1986.
- DROST, M.; ALEXIEV, A.; VLAHOV, K.; KARAIVANOV, O.; CRIPE, W.S.; LEONARDS, A.P.; KACHEVA, D.; POLIHRONOV, O.; NICOLOV, N.; PETROV, M.; DRAGOEV, A. Successful nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*) in Bulgaria. Theriogenology, Los Altos, Calif., 30(4):659-68, 1988.
- KARAIVANOV, C. Comparative studies on the superovulatory effect of PMSG and FSH in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology, Los Altos, Calif., 26(1):51-9, 1986.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D. & SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology, Los Altos, Calif., 19(1):55-81, 1983.
- SHARIFUDDIN, W. & JAINUDEEN, M.R. Superovulation and nonsurgical collection of ova in water buffalo (*Bubalus bubalis*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., Champaign, Ill., 1984. Brief communications... Champaign, Ill., University of Illinois, 1984. v.2., p.240-2. (Paper,240).