

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO EM OVELHAS EM ANESTRO TRATADAS COM GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA RECOMBINANTE

JULIA NOBRE BLANK CAMOZZATO¹; GABRIEL MAGGI²; FABIANE PEREIRA DE MORAES³; FERNANDO CAETANO DE OLIVEIRA⁴; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – julia.camozzato@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gabrielmaggi98@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabypmoraes@gmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul – fcoliveiravet@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bqgasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em regiões subtropicais, como no Sul do Brasil, os ovinos apresentam sazonalidade reprodutiva. Nesta espécie, a glândula pineal atua como um mecanismo regulador da função reprodutiva, devido a atuação indireta da melatonina sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário. A diminuição da melatonina, decorrente do aumento das horas de luz por dia, resulta na diminuição da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, conseqüentemente, do hormônio luteinizante (LH) (GOODMAN, et al., 2010).

Essa característica pode apresentar-se como um limitante para a ovinocultura, impedindo o aproveitamento do máximo potencial reprodutivo durante o ano. Contudo, com a utilização de gonadotrofinas exógenas, é possível a indução de crescimento folicular e ovulação, mesmo em períodos de anestro estacional. Dessa forma, é possível induzir a ciclicidade para que a parição ocorra em épocas mais favoráveis no que se refere à nutrição e ao momento de vendas. Além disso, tratamentos hormonais viabilizam os sistemas com três partos em dois anos (ABECIA; FORCADA; GONZÁLEZ-BULNES, 2011).

Os protocolos convencionais de indução/sincronização para ovinos em anestro consistem na inserção de dispositivos intravaginais (DIVs) contendo progesterona (P4) ou análogos por 6 a 14 dias, aplicação ou não de prostaglandina (PGF2 α), dependendo do tempo de protocolo, e administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2020). O uso de eCG torna-se imprescindível nos casos de anestro, devido ao seu efeito semelhantes ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e LH, ligando-se aos respectivos receptores nos folículos, promovendo crescimento folicular final e suprimindo a carência de gonadotrofinas (MURPHY, 2012).

Todavia, uma nova onda de movimento em prol do bem-estar animal, principalmente advinda de países europeus, visa a abolição do uso de eCG purificada (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2020). Esse hormônio é secretado pelos cálices endometriais de éguas prenhes, presente em altas concentrações entre os 50 e 80 dias de gestação (ESTRADÉ et al., 2016). Dessa forma, para sua obtenção, sangue é coletado semanalmente de éguas gestantes (VILANOVA et al., 2019).

Atualmente, substitutos ao uso de eCG vêm sendo explorados, como o FSH, GnRH e a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Entretanto, ainda sem resultados com eficiência comparável a eCG para uso no anestro estacional ou na inseminação em tempo fixo (BRUNO-GALARRAGA et al., 2021; MAGGI et al., 2024; SANTOS-JIMENEZ et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021). Em vista disso, esse trabalho se propõe a explorar o uso da gonadotrofina coriônica equina

recombinante (reCG) sobre a dinâmica folicular e ovulação de ovinos fora da estação reprodutiva.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL. Nesse trabalho foram utilizadas 27 fêmeas ovinas não gestantes e não lactantes, com mais de 12 meses, mediana de ECC de 2 (escala de 1-5) e média de peso de 45,2 kg. O experimento ocorreu no início de setembro, durante o período de anestro sazonal da latitude correspondente. Os animais receberam, no início do protocolo (dia zero; D0), um dispositivo intravaginal (DIV) contendo 0,36g de progesterona (P4; Primer PR, Agener União, Brasil), mantido por 7 dias (D7). No mesmo dia da retirada do DIV, aplicou-se 250 µg de cloprostenol sódico (PGF; Estron; Agener União, Brasil) por via intramuscular (IM) em todos os animais, que foram subsequentemente alocados em três grupos: Controle (n=9), sem tratamento de gonadotrofina; eCG (n=9), 400 UI de gonadotrofina coriônica equina purificada (SincroeCG Ourofino, Brasil); e reCG (n=9), 105 UI de gonadotrofina coriônica equina recombinante (FOLI-REC, Ceva, Brasil).

Para dinâmica folicular, foram realizadas análises por ultrassonografia transretal 24, 36 e 48 horas após a retirada do DIV, utilizando transdutor linear transretal de 7.5-MHz (SonoScape E2V, Shenzhen, China). A taxa de ovulação foi mensurada 7 dias após retirada do DIV pela presença de corpo lúteo (CL). Para realização das análises estatísticas, utilizou-se o software JMP18, considerando um nível de significância de 5%. A distribuição dos resultados foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A dinâmica de crescimento folicular foi avaliada por análise de dados repetidos. O crescimento folicular em 24 h e número de CLs foi avaliado por análise de variância (ANOVA), com as médias comparadas por Tukey. A taxa de ovulação foi avaliada por regressão logística.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de dados repetidos, houve uma tendência de efeito do tratamento ($p = 0,06$), com efeito do momento de avaliação ($p < 0,0001$) e tendência de interação tratamento*momento ($p = 0,10$). Observou-se diferença no diâmetro do folículo pré-ovulatório 48 h após remoção do DIV, com maior diâmetro no grupo eCG ($p = 0,034$). Os resultados corroboram com o esperado em relação aos grupos eCG e controle, evidenciando a necessidade do uso da suplementação gonadotrófica durante o período de anestro sazonal (DIAS et al., 2020). A falta de diferença estatística entre o grupo reCG e os demais, na análise de dados repetidos, 48 h após a retirada do DIV, pode ter sido decorrente do número reduzido de animais, considerando que as taxas de ovulação e crescimento foram estatisticamente semelhantes entre os grupos eCG e reCG, e superior ao do grupo controle.

Considerando apenas a taxa de crescimento entre 24 e 48 h, houve efeito dos tratamentos ($p=0,01$), eCG e reCG ($1,07\pm 0,26$ e $1,06\pm 0,26$ mm/dia, respectivamente), em relação ao controle ($0,01\pm 0,26$ mm/dia). Para taxa de ovulação, o grupo controle, eCG e reCG, apresentaram 0% (0/9), 100% (9/9) e 88,9% (8/9) de ovulação, respectivamente. O número de CLs presente por animal foi influenciado pelo tratamento ($p<0,0001$), com diferença entre grupo controle (0) e os tratamentos eCG ($1,44\pm 0,15$) e reCG ($1,11\pm 0,15$), nos quais 44% (4/9) e 25% (2/8) das ovulações foram duplas, respectivamente. A capacidade de ovulação

múltipla com o uso de eCG já é bem estabelecida, tal qual seu potencial em protocolos de superovulação e transferência embrionária (FORCADA et al., 2011). Em roedores, caprinos e bovinos, estudos já demonstraram a eficiência das glicoproteínas recombinantes com atividade semelhante ao eCG em protocolos de superovulação (BRUNO-GALARRAGA et al., 2022; CRISPO et al., 2021; VILLARRAZA et al., 2021).

Até o presente momento, esse é o primeiro estudo avaliando o uso de reCG em ovinos para sincronização de ovulação, que seja do conhecimento dos autores. A dose de reCG definida foi baseada em trabalhos utilizando a reCG em bovinos, nos quais VILLARRAZA et al., (2021) evidenciaram que doses tão baixas quantas 105 UI de reCG apresentaram taxas de prenhez semelhante a 400 UI de eCG. Em outro estudo, CATTANEO et al., (2024) observaram um efeito negativo com essa dosagem em vacas com cria ao pé, sendo a dose de 84 UI reCG e 300 UI eCG mais adequadas. Ainda assim, optou-se pelo uso de 105 UI de reCG devido as exigências da espécie ovina em anestro que requererem maiores doses de eCG (400 a 500 UI) (ABECIA; FORCADA; GONZÁLEZ-BULNES, 2011).

4. CONCLUSÕES

O uso de reCG se mostrou eficiente para promover crescimento folicular e induzir a ovulação em ovelhas durante anestro sazonal. Ainda assim, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da reCG sobre os parâmetros de função lútea, manifestação de estro e prenhez, assim como sincronização da ovulação para uso associado a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 67-79, 2011.

BRUNO-GALARRAGA, M.; FERNANDEZ, J.; CATTANEO, L.; BO, G.; GIBBONS, A.; CUETO, M. Superovulatory response and embryo production using a bioactive recombinant equine chorionic gonadotrophin in goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n. 2, 2022.

BRUNO-GALARRAGA, M.; CANO-MORENO, V.; LAGO-CRUZ, B.; ENCINAS, T.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; MARTINEZ-ROS, P. The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. **Animals**, v. 11, n. 4, 2021.

CATTANEO, L.; PRIETO, C.; OJEDA, D.; PEREIRA, A.; FRUTOS, J; BÓ, G.A. The use of a recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in fixed-time AI programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 227, p. 77–83, 2024.

CRISPO, M.; MEIKLE, M.N.; SCHLAPP, G.; MENCHACA, A. Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. **Theriogenology**, v. 164, 2021.

DIAS, J.H.; MIRANDA, V.O.; OLIVEIRA, F.C.; VARGAS JR, S. F.; HAAS, C.S.; COSTA, V.G.G.; LUCIA JR, T.; VIEIRA, A.D.; CORCINI, C.D; GASPERIN, B.G.

Treatment with eCG and hCG to induce onset of estrous cycles in ewes during the non-breeding season: Effects on follicular development and fertility. **Animal reproduction science**, v. 212, p. 106232, 2020.

ESTRADÉ, M.J., CAZALES, N., PERDIGÓN, F., CAVESTANY, D. AND MATTOS, R.C. eCG concentration and subsequent reproductive activity in mares after abortion at day 70. **Journal of Equine Veterinary Science**, 42, p. 88-93, 2016.

FORCADA F.; AMER-MEZIANE M. A.; ABECIA J. A.; MAUREL M. C.; CEBRIÁN-PÉREZ J. A.; MUIÑO-BLANCO T.; ASENJO B.; VÁZQUEZ M. I.; CASAO A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, 2011.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; MENCHACA, A.; MARTIN, G.B.; MARTINEZ-ROS, P. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 5, p. 441–452, 2020.

GOODMAN, R. L.; JANSEN, H. T.; BILLINGS, H. J.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M.N. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. 674-681, 2010.

MAGGI, G.; PIRES, O. S.; VARGAS JR, S. F.; OLIVEIRA, F. C.; MORAES, F. P.; FERREIRA, R.; VIEIRA, A. D.; ROVANI, M. T.; GONÇALVES, P. B.; MONDADORI, R. G.; GASPERIN, B. G. Is it possible to replace eCG by GnRH in the hormonal protocol for timed artificial insemination in ewes during the breeding season? **Domestic Animal Endocrinology**, v. 89, p.106878, 2024.

MURPHY, B.D. Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, 2012.

SANTOS-JIMENEZ, Z.; MARTINEZ-HERRERO, C.; ENCINAS, T.; MARTINEZ-ROS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 7, 2020.

SILVEIRA, D.C.; VARGAS JR, S. F.; OLIVEIRA, F. C.; BARBOSA, R. M.; KNABAH, N. W.; GOULARTE, K. L.; VIEIRA, A. D.; BALDASSARRE, H.; GASPERIN, B. G.; MONDADORI, R. G.; LUCIA JR, T. Pharmacological approaches to induce follicular growth and ovulation for fixed-time artificial insemination treatment regimens in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 228, 106734, 2021.

VILANOVA, X. M.; DE BRIYNE, N.; BEAVER, B.; TURNER, P. V. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. **Animals**, v. 9, n. 12, 2019.

VILLARRAZA, C. J.; ANTUÑA, S.; TARDIVO, M. B.; RODRÍGUEZ, M. C.; MUSSIO, P.; CATTANEO, L.; FONTANA, D.; DÍAZ, P. U.; ORTEGA, H. H.; TRÍBULO, A.; MACAGNO, A. Development of a suitable manufacturing process for production of a bioactive recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in CHO-K1 cells. **Theriogenology**, v. 172, p. 8-19, 2021.