



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Termas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

Efeito da polivinilpirrolidona sobre a atividade estral e ovariana de ovelhas Dorper submetidas à produção *in vivo* de embriões no Nordeste do Brasil: Resultados parciais

Celso Henrique Souza Costa Barros¹, Thiago Vinicius Costa Nascimento², Daniel Maia Nogueira³,
Maria Luciana Lira de Andrade-Lopes⁴, Mabel Freitas Cordeiro⁵, Edilson Soares Lopes Júnior⁵

¹Discente de Medicina Veterinária, membro do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Bolsista PIBIC/CNPq (Barros, C.H.S.C.). e-mail: celso_bar@hotmail.com

²Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (CPGCA), membro do LAFIBRA/UNIVASF, Bolsista FACEPE. e-mail: thiagovcn_vet@hotmail.com

³Pesquisador do CPATSA – Embrapa Semiárido. e-mail: daniel@cpatsa.embrapa.br

⁴Professora Assistente I – Colegiado de Medicina/UNIVASF. e-mail: andrade319@hotmail.com

⁵Professor(a) Adjunto(a) – UNIVASF, responsável técnico(a) do LAFIBRA/UNIVASF. e-mail: mfreitascordeiro@yahoo.com.br (Cordeiro, M.F.), edilsonlopesjunior@yahoo.com.br (Lopes Júnior, E.S.)

Resumo: Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da polivinilpirrolidona (PVP) sobre o percentual de animais em estro, taxa de ovulação, taxa de recuperação embrionária, taxa de fertilização e qualidade de embriões, em ovelhas Dorper. Para isso, as ovelhas foram submetidas à superovulação com a aplicação única da associação de pFSH com PVP, nos pesos moleculares de 10.000 e 40.000 e concentração de 30%. Foram utilizadas, como doadoras de embriões, seis ovelhas da raça Dorper, as quais foram distribuídas em 3 grupos ao acaso, segundo a idade, peso, escore corporal e histórico reprodutivo. Todas as fêmeas foram submetidas a um tratamento de sincronização do estro de 12 dias de impregnação progestágena e, para isso, as ovelhas receberam dispositivos intravaginais impregnados com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Pfizer, Brasil). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os três grupos, será utilizada a análise de variância (ANOVA). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher ou Qui-quadrado, conforme a normalidade dos dados. Os testes foram realizados a uma probabilidade de 5%. Todas as doadoras apresentaram em estro. Os grupos controle, PVP10 e PVP40 mostraram estro às $36,0 \pm 2,6$, $32,0 \pm 2,6$ e $36,0 \pm 2,6$, respectivamente, mas não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$). Quanto ao percentual de fêmeas ovulando, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. No presente estudo, não se obteve resposta superovulatória com uma única aplicação de pFSH dissolvido em PVP. Podemos concluir que altas dosagens de pFSH não permite verificar o verdadeiro efeito da associação pFSH-PVP 10 ou pFSH-PVP 40. Pesquisas adicionais com dosagens de pFSH em outras concentrações devem ser avaliadas.

Palavras-chave: nordeste do Brasil, ovinos, polivinilpirrolidona, produção de embriões

Effect of polyvinylpyrrolidone on ovarian and estrus activity of Dorper ewes submitted to *in vivo* embryo production at Northeastern of Brazil: Preliminary results

Abstract: These study was performed to evaluate the effects of polyvinylpyrrolidone (PVP) on percentage of animals in estrus, ovulation rate, embryo recovery rate, fertilization rate and embryo quality in Dorper ewes. For this, ewes were submitted to superovulation using one administration of the association pFSH with PVP which was used with molecular weights of 10,000 and 40,000 and concentration at 30%. Six Dorper ewes were used as embryo donors that were randomly allocated at three groups concerning birth date, body weight, body condition score and reproductive history. All of females were submitted to estrus synchronization treatment for 12 days of progestagen impregnation and, for this, ewes received intravaginal devices impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon[®], Pfizer, Brazil). The results were expressed as mean \pm standard error. To compare several parameters among three groups it will be used the Analysis of Variance (ANOVA). Data expressed as percentage were submitted to Fisher test or Chi-square concerning normality of results. Tests were performed at probability of 5%. All of embryo donors showed estrus. Control, PVP10 and PVP40 groups showed estrus at 36.0 ± 2.6 , 32.0 ± 2.6 and 36.0 ± 2.6 , respectively, but it was not verified significant difference ($P > 0.05$). Concerning percentage of females ovulating it was not observed significant difference ($P > 0.05$) among groups. In this study, it was not verified superovulation with one



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

administration of pFSH diluted in PVP. We can conclude that high dosages of pFSH do not permit verify the true effect of association pFSH-PVP 10 or pFSH-PVP 40. Additional researches with different pFSH dosages and other PVP concentrations might be evaluated.

Keywords: embryo production, northeastern of Brazil, polyvinylpyrrolidone, sheep

Introdução

No Brasil, o rebanho ovino tem 16 milhões. Demonstrando a importância da ovinocultura nessa região. Além disso, há o mercado de animais geneticamente especializados que, através dos leilões, tem movimentado um grande volume de dinheiro, com a possibilidade de melhoramento do rebanho, proporcionando uma produção mais eficiente e a possibilidade de agregar mais valor aos produtos.

Isto é possibilitado com o uso de técnicas da reprodução, que possibilitam a aceleração do ganho genético e o aumento do potencial produtivo de ovinos. Dentre essas técnicas, destacam-se a Inseminação Artificial (IA) e a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE). Esta última, certamente, atua na melhoria da qualidade genética do rebanho, através do aumento na pressão de seleção e da redução do intervalo entre gerações.

Para tanto, a superovulação tem sido conseguida através da administração de gonadotrofinas exógenas, incluindo extratos de pituitária suína (Armstrong & Evans, 1983), que são administradas em doses múltiplas, duas vezes ao dia, por um período de 2-4 dias, a fim de manter os níveis adequados de circulação sanguínea para sustentar o crescimento de muitos folículos, uma vez que esta droga possui curta meia-vida.

Recentes tentativas foram feitas para simplificar os protocolos de superovulação, reduzindo o número de doses de pFSH. A polivinilpirrolidona é um polímero orgânico sintético com diferentes pesos moleculares (10.000, 40.000 ou 360.000), altamente solúvel em água e em uma ampla gama de solventes orgânicos. É utilizado para o processamento das chamadas “drogas de longa ação” devido às suas propriedades de se ligar e estabilizar muitas moléculas, prolongando assim a sua taxa de depuração in vivo. Como sempre, pouco se sabe sobre os fatores que podem afetar a habilidade do PVP em agir como um veículo para o FSH.

Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da PVP sobre percentual de animais em estro, taxa de ovulação, taxa de recuperação embrionária, taxa de fertilização e qualidade de embriões em ovelhas Dorper, quando submetidas à superovulação com a aplicação única da associação de pFSH e PVP, em diferentes pesos moleculares (10.000 e 40.000) e concentração de 30%.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Cabanha Qualitá, localizada em Juazeiro/BA, (9°24'50" de latitude Sul e 40°30'10" de longitude Oeste). Os animais foram submetidos a um regime semi-intensivo de produção. Pela manhã, permaneceram em pastos cultivados de capim buffel (*Cenchrus ciliaris*) e, durante a tarde, receberam, em instalações cobertas, suplementação volumosa de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrado a base de farelo de milho e soja, com 18% de proteína bruta, o que lhes garantiu os requerimentos energéticos e protéicos para estação sexual ou fase inicial da gestação. Os animais tiveram, ainda, livre acesso à água e a sal mineral. A sanidade destes animais foi mantida através de vermifugação quatro vezes ao ano, casqueamento periódico e descarte orientado quanto à linfadenite caseosa.

Foram utilizadas, como doadoras de embriões, seis fêmeas ovinas da raça Dorper, as quais foram distribuídas em 3 grupos ao acaso, segundo a idade, peso, escore corporal, condição e histórico reprodutivo. Todas as fêmeas foram submetidas a um tratamento de sincronização do estro de 12 dias de impregnação progestágena, onde foram inseridos dispositivos intravaginais impregnados com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], PFIZER, Brasil). Todavia, só no o Grupo 1 ou Controle (n = 2; T1), as ovelhas receberam, intramuscularmente e a partir de 48 horas antes da retirada da esponja, 400 UI de NIH-FSH-P1, fracionadas em seis doses decrescentes de NIH-FSH-P1 (Pluset, Pfizer, Brasil), a cada 12 horas (100/100, 50/50 e 50/50 UI) e 75 µg de d-cloprostenol (Ciosin, Intervet Schering, Brasil). No Grupo 2 ou PVP10 (n = 2; T2), foi administrado uma dose única de 400 UI de NIH-FSH-P1 (Pluset, Pfizer, Brasil), dissolvidas em uma solução de polivinilpirrolidona com peso molecular 10.000 a 30%



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

(w/v) (Sigma–Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), 24 h antes da remoção da esponja. E, por fim, no Grupo 3 ou PVP30 (n = 2; T3), o tratamento foi feito por aplicação única de 400 UI de NIH-FSH-P1 (Pluset, Pfizer, Brasil), dissolvidas em uma solução de polivinilpirrolidona com peso molecular 40.000 a 30% (w/v) (Sigma–Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), 24 h antes da remoção da esponja.

Utilizando um carneiro sem padrão racial definido (SPRD) e vasectomizado, foi detectado o início do estro das ovelhas, a partir de 12 horas após a remoção da esponja e, então, a cada quatro horas, durante 72 h após a retirada da esponja. Ainda, utilizou-se um carneiro Dorper, como reprodutor, de fertilidade comprovada para efetuar a cobertura das fêmeas em estro, no início do estro e 24 h após. A fim de verificar a resposta ovulatória, as fêmeas foram submetidas, imediatamente antes da colheita de embriões, a uma laparoscopia (Oldham & Lindsay, 1980). A ocorrência de, pelo menos, cinco ovulações caracterizou a ocorrência de superovulação. A colheita de embriões foi realizada pelo método de laparotomia, segundo o método descrito por (Ishwar e Memon, 1996). O lavado recuperado foi vertido em placas plásticas de Petri e submetido à procura de embriões em estereomicroscópio (TNE 10 B, Ophthon, China) utilizando um aumento de 40 a 70 X para procura e avaliação das estruturas, quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade seguindo os critérios morfológicos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, como embriões de grau I (excelente ou bom), II (regular), III (pobre) e IV (morto ou degenerado).

Foram registradas as seguintes variáveis: ocorrência e momento do estro; taxa de ovulação das doadoras; taxa de recuperação embrionária; taxa de fertilização; estágio de desenvolvimento e características qualitativas dos embriões recuperados. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os três grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher ou Qui-quadrado, conforme a normalidade dos dados. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem nível de significância menor que 5%.

Resultados e Discussão

Todas as doadoras entraram em estro (Tabela 1), num intervalo entre a retirada da esponja e o início do estro para o grupo controle foi de 36 horas. Contudo, D’Alessandro et al. (2001) obtiveram início de estro para o grupo controle de $27,9 \pm 2,6$ administrando 250 UI e utilizando 30 mg de acetato de fluorogesterona (FGA). Para os animais do presente estudo, as ovelhas do grupo PVP 10 apresentaram início de estro de 32 horas e o grupo do PVP 40 apresentou estro, 36 horas após a remoção da esponja (Tabela 1).

Tabela 1. Intervalo médio (\pm e.p.) entre a retirada da esponja e início do estro (RE – IE) e % de ovelhas ovulando (\pm e.p.) de estro.

Grupos	Número de animais	RE-IE (h)	% de ovelhas ovulando
Controle	2	$36,0 \pm 2,6$	100
PVP 10	2	$32,0 \pm 2,6$	100
PVP 40	2	$36,0 \pm 2,6$	50

Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).

Os resultados dos grupos PVP 10 corroboram com aqueles obtidos por D’Alessandro et al. (2001) que encontraram o início do estro das ovelhas às $33,0 \pm 5,1$ h, quando do uso da associação pFSH-PVP10. Já no tocante ao início do estro de doadoras de embriões submetidas à associação pFSH-PVP40, os nossos resultados foram um pouco diferentes, pois aqueles autores encontraram $40,2 \pm 3,0$ h, sendo este intervalo considerado uma resposta de estro tardia.

Quanto ao percentual de fêmeas ovulando, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 1). No animal que não ovulou (Grupo PVP40) pudemos observar que os ovários estavam completamente lisos e atípicos e útero bastante delgado. Todas as doadoras não apresentaram superovulação e suas taxas de ovulação foram inferiores às relatadas por D’Alessandro et al. (2001) que, utilizando o PVP 40, encontraram taxas de ovulação de $6,2 \pm 1,2$ e taxas de ovulação com o PVP 10 de $8,1 \pm 1,7$. Ainda em contradição ao nosso estudo, Simonetti et al. (2007), utilizando o PVP 40 associado a oFSH, encontraram taxas de ovulação de $4,7 \pm 1,0$.



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

Foi observada a presença de um cisto ovariano no ovário esquerdo de uma ovelha do grupo PVP10 e a ocorrência de ovário esquerdo atípico de uma ovelha do grupo controle. Essa resposta ovariana indesejada no presente estudo pode ser atribuída a altas doses de FSH/ LH administrados, as quais induziram a formação de folículos persistentes (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de ovelhas, de ovelhas superovulando, de corpos lúteos, folículos persistentes, de oócitos recuperados, embriões graus (I-III), embriões(IV) e taxa de recuperação dos grupos FSH controle, FSH/PVP 10 e FSH/ PVP 40.

Tratamento	Grupo Controle	Grupo PVP 10	Grupo PVP 40
Nº de ovelhas	2	2	2
Nº de ovelhas superovulando	0	0	0
Nº de corpos lúteos	4	5	1
Nº de folículos persistentes	4	9	0
Nº de oócitos recuperados	0	1	0
Nº de embriões			
Graus (I-III)	2	2	0
Grau IV	0	0	0
Taxa de recuperação(%)	50	60	0

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P>0,05$).

A imprevisibilidade da resposta ovariana à superovulação, ou a impossibilidade de assegurar que uma doadora em potencial produza um número satisfatório de bons embriões em determinado período de tempo, é aspecto limitante da contribuição que a transferência de embriões pode trazer ao melhoramento genético. Os principais fatores que contribuem para a imprevisibilidade dessa técnica são os mesmos encontrados nos bovinos, dentre eles incluem a diminuição da resposta à superestimulações repetidas, além de fatores ligados à idade da doadora; condições estressantes; associação a implantes de progesterona; dia do início do tratamento; pureza do hormônio (relação FSH/LH); e dose do hormônio (López Sebastián, 2006).

No presente estudo, não se obteve resposta superovulatória com uma única aplicação de FSH dissolvido em PVP. Já os estudos de D'Alessandro et al. (2001) mostraram que uma única injeção de FSH dissolvido em PVP pode induzir em ovelhas uma resposta superovulatória similar àquela obtida utilizando protocolos padrão dose-múltipla. Simonetti et al. (2007) explicam que as doses iniciais maiores de FSH em um protocolo com doses decrescentes pode induzir rápido e anormal desenvolvimento folicular ovariano e, assim, prejudicar a sincronização de crescimento do oócito-folículo, causando uma redução na qualidade do embrião. Isto é consistente com o padrão geral de uma associação entre uma maior estimulação ovariana e uma diminuição de oócitos e / ou produção de embriões (Armstrong & Evans, 1983). Isto tem sido observado mais freqüentemente em animais tratados com uma dose alta de gonadotrofinas, sugerindo que pode estar relacionado à estimulação excessiva do folículo e / ou a altos níveis circulantes de estrogênio durante a fase luteal inicial. O acelerado desenvolvimento folicular pode ter levado à ovulação de folículos, antes das células da granulosa adquirirem maturidade necessária para luteinização adequada, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (Armstrong & Evans, 1983).

Conclusões

Assim, podemos concluir que a alta dosagem de pFSH não permite verificar o verdadeiro efeito da associação pFSH-PVP 10 ou pFSH-PVP 40. Portanto, novos trabalhos com dosagens de pFSH em outras concentrações devem ser avaliadas.

Agradecimentos

Agradeço ao Senhor Adilson Moura, proprietário da Cabanha Qualitá por todo o financiamento da pesquisa, à equipe do LAFIBRA, pelo apoio na execução do trabalho, e à FAPESB, pela bolsa de iniciação científica que me foi concedida.

Literatura citada

ARMSTRONG, D.T; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats.



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

Theriogenology, v. 19, p. 31-42, 1983.

D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M.G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.255–264, 2001.

ISHWAR, A .K.; MEMON, M. A . Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v. 19, p. 35-46, 1996.

LÓPEZ SEBASTIÁN, A.; GONZÁLEZ DE BULNES, A.; MORENO, J. S. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Compendio de Conferencias. **XXIX Curso Internacional de Reproducción animal**. Madrid, p.43-52, 2006.

OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 119-124, 1980.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O. E.; CAROU, N.; ALBERIO, R. H.; ABECIA, J. A.; PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, Article in press, 2007.