

Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos¹

Use of hCG to improve the reproductive characteristics and fertility in recipients mares

Perla D.C. Fleury², Maria A. Alonso², Fernando A.C. Sousa³, André F.C. Andrade³, Rubens Paes Arruda³

²Fleury Reprodução Equina, São José do Rio Pardo, SP,

³Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, FMVZ –USP, Campus Pirassununga, SP,

Correspondência: perlafleury@hotmail.com; arrudarp@usp.br

Resumo

A técnica de transferência de embriões (TE) consagrou-se como importante ferramenta no melhoramento genético do rebanho eqüino. O incremento nas taxas de gestação, em programas de TE, seria fundamental para viabilização dos custos ainda elevados. Entre os diversos fatores que influenciam os resultados desta técnica, destaca-se a égua receptora. Por isso, estudos têm sido realizados sobre o dia ideal do ciclo para a TE e sobre o uso de drogas no intuito de melhorar o perfil progesterônico da égua receptora, utilizando anti-prostaglandínicos, progesterona e mais recentemente a hCG e análogos do GnRH. O objetivo principal dos trabalhos, recentemente realizados por nosso grupo, foi o de observar os efeitos da hCG sobre as características reprodutivas e taxa de prenhez em éguas receptoras de embrião. Como resultado destes experimentos, observamos que a aplicação da hCG em éguas receptoras tanto para indução da ovulação, como no dia seguinte da ovulação (d1), ou ainda no dia da transferência (d5 a d8), promoveu um aumento na concentração plasmática de progesterona, uma tendência a melhor taxa de prenhez quando aplicado no dia da TE, e ainda uma melhora nas características reprodutivas quando aplicado no d1. Portanto a hCG pode ser utilizada não só na indução da ovulação como também na melhoria das características reprodutivas das receptoras, possibilitando assim uma redução na relação doadora /receptora.

Palavras-chave: eqüinos, embriões, hCG, características reprodutivas, taxa de prenhez.

Abstract

The Embryo transfer technique (ET) is already known as an important tool in genetic improvement of the equine breeding. An increase in pregnancy rates resulting from ET programs would be fundamental to make the still high costs, viable. Among the several factors that influence the results of this technique, the recipient mare plays a major role. Thus, it has been studied the ideal day of the cycle for the ET, drug applications in order to improve the progesteronic status, using anti-prostaglandinics, progesterone and recently, hCG and GnRH analogues. The aim of these studies was to evaluate the effects of hCG on reproductive characteristics and pregnancy rates of embryo transfer recipients. As noticed in these experiments, the application of hCG in recipient mares to induce ovulation and on the day after ovulation (d1), or on the day of embryo transfer (d5 till d 8), caused an increase in plasmatic progesterone concentration, a tendency of higher pregnancy rate when given on the day of transfer, and also an improvement of reproductive characteristics when given on day 1. The use of hCG in recipients in an ET program seems to optimize the use of the recipient candidates, as it increases the progesterone production and the percentage of approved mares at the selection for transfer. Therefore, the hCG can be used not only in inducing ovulation but also in the improvement of reproductive characteristic in recipient mares, permitting the reduction of donor/recipient ratio.

Keywords: equine, embryos, hCG, reproductive characteristics, pregnancy rate.

Introdução

A técnica de transferência de embriões (TE) é uma importante ferramenta para o melhoramento genético por permitir uma maior influência das linhagens maternas, pois promove a obtenção de um maior número de produtos ao ano, além de permitir que potras com dois anos de idade sejam utilizadas como doadoras, levando à diminuição do intervalo entre gerações e, conseqüentemente aumentando a velocidade e eficiência do melhoramento genético do plantel. A TE também permite a obtenção de gestações de éguas que se tornaram subfêrteis por problemas adquiridos, cuja causa não tenha relação direta com a fertilização do oócito e seu transporte até o útero. Esta técnica promove ainda o melhor aproveitamento de éguas de alto valor zootécnico, idosas ou que estejam participando de competições hípcas.

No Brasil, a TE em eqüinos foi primeiramente descrita em 1987 por Fleury *et al.* adaptando a metodologia descrita por Douglas (1979) às condições brasileiras. Porém, com o advento de novos estudos e

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 2 de junho de 2007, Curitiba/PR.

com os resultados positivos encontrados a metodologia atualmente utilizada é a transferência não cirúrgica coberta, associada à avaliação e seleção da égua receptora. Para se obter sucesso em um programa de TE, os técnicos dependem de diversos fatores relacionados à égua doadora, ao garanhão, à manipulação e manutenção dos embriões, à técnica de transferência, à receptora, as condições climáticas, entre outros. Entretanto, o fator mais importante certamente está relacionado à égua receptora, já que esta irá reconhecer o embrião e terá que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento.

Atualmente, o grande entrave para uma maior utilização da técnica de TE pelos criadores são as receptoras. Para cada embrião a ser transferido, o ideal são ter três receptoras sincronizadas com a doadora, para serem avaliadas anteriormente a transferência do embrião. Considera-se fundamental a utilização de receptoras com o aparelho reprodutivo em perfeitas condições e que estejam responsivas aos estímulos da progesterona, ou seja, apresentando corpo lúteo, com tônus uterino e cervical elevado e ausência de edema uterino. Este fato embasado nos melhores índices de prenhez obtidos quando se utiliza receptoras apenas de primeira e segunda escolha, ou seja, éguas que apresentam as melhores características reprodutivas de diestro (tônus uterino e cervical elevados, morfoecogenicidade uterina homogênea e presença de corpo lúteo) e ausência de qualquer anormalidade uterina e vaginal (Arruda *et al.*, 2001).

Visando melhorar a qualidade da receptora e conseqüentemente a taxa de prenhez, pesquisadores têm buscado estudar métodos de aumentar o perfil progesterônico das receptoras, já que é reconhecido que animais com concentrações maiores de progesterona apresentam maiores taxas de prenhez, tônus uterino e cervical mais elevados e ausência de edema uterino. Em busca do aumento do perfil progesterônico, tem se utilizado a aplicação de fármacos como anti-prostaglandínicos, progesterona e mais recentemente a hCG e análogos do GnRH.

Buscando responder qual fármaco melhor atuaria no aumento do perfil progesterônico e conseqüentemente na taxa de prenhez, foi realizado em conjunto a Central Fleury Reprodução Equina e o Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da FMVZ - USP (Campus de Pirassununga) um primeiro trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos da hCG, de um análogo do GnRH e de um progestágeno (Norgestomet) em éguas candidatas à receptoras de embrião.

Material e Método – Experimento 1

Este estudo, realizado na Central Fleury Reprodução Equina, utilizou 52 doadoras e 66 receptoras, todas da raça Mangalarga no intuito de comparar diferentes tratamentos hormonais aplicados no dia da transferência dos embriões, ou seja, entre 5 e 8 dias (d5 a d8) após a ovulação (d0). Os objetivos principais foram: avaliar a taxa de prenhez relacionando-a com as concentrações plasmáticas de progesterona. Os animais foram divididos em 4 grupos e receberam tratamento no dia da TE conforme descrição abaixo:

- G1(n=18): Controle, solução salina, 5mL IM;
- G2(n=17): 40 µg de acetato de buserelina, IM;
- G3(n=16): 3000 UI de hCG, IM;
- G4(n=16): implante de norgestomet, 3mg, SC.

Resultados

A concentração plasmática de progesterona entre o dia da transferência (d5 a d8) e o dia 13 do embrião (diagnóstico de gestação) apresentou aumento significativo ($P<0,001$) nas receptoras tratadas com hCG (G3) no dia da TE (Tab. 1).

Tabela 1. Concentração plasmática de progesterona (média \pm erro padrão) em éguas receptoras do dia da ovulação até o dia do diagnóstico de gestação (D 13) submetidas a diferentes tratamentos hormonais no dia da TE.

Tratamento	n	P4 (ng/mL)
Controle	97	7,8 \pm 0,38 ^a
Buserelina	85	9,3 \pm 0,27 ^b
hCG	83	11,8 \pm 0,44 ^c
Norgestomet	71	9,9 \pm 0,45 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P<0,05$)

As taxas de prenhez das receptoras não diferiram estatisticamente entre os grupos ($P>0,05$), porém, observou-se um aumento numérico na taxa de prenhez em todos os grupos em relação ao grupo controle (Tab. 2). Destaca-se a diferença numérica nesta taxa tanto no dia 13 como no dia 16 entre o grupo tratado com hCG e os demais grupos (Tab. 2). Quando comparado com o grupo controle, o grupo tratado com hCG demonstrou um aumento de 20,8 e de 25,7 pontos percentuais na taxa de prenhez aos 13 e 16 dias, respectivamente.

Após a análise dos dados encontrados no 1º experimento foi proposto um segundo experimento, este

também realizado na Central Fleury Reprodução Equina.

Tabela 2. Taxa de prenhez (média \pm erro padrão) nos dias 13 e 16, em éguas receptoras submetidas a diferentes tratamentos no dia da TE.

Tratamento	n	Taxa de prenhez (%)	
		D13	D16
Controle	18	66,7 \pm 0,11	55,6 \pm 0,12
Buserelina	17	70,6 \pm 0,11	70,6 \pm 0,11
hCG	16	87,5 \pm 0,08	81,3 \pm 0,10
Norgestomet	16	75,0 \pm 0,11	75,0 \pm 0,11

P>0,05

Material e Método - Experimento 2

Para este experimento foram utilizadas 84 éguas Mangalarga candidatas a receptoras de embriões. O experimento teve como objetivos: verificar nos dias D0 (dia da ovulação), D2, D4, D6 e D8 se o uso da hCG altera a concentração plasmática de progesterona; avaliar no sexto dia pós-ovulação (D6) os efeitos da aplicação da hCG em fêmeas equinas sobre as características reprodutivas: tônus uterino e cervical, morfoecogenicidade uterina; e ainda, avaliar o efeito da aplicação da hCG sobre a ordem de escolha em fêmeas equinas examinadas no sexto dia pós-ovulação (D6). As receptoras foram aleatoriamente divididas em 3 grupos (G) que receberam os seguintes tratamentos:

G 1 - Administração, IM, de 1 mL de solução fisiológica, quando o folículo atingiu diâmetro médio igual ou maior que 35 mm.

G 2 - Administração de 2.500 UI de hCG (Vetecor[®]), IM, quando o folículo atingiu diâmetro médio igual ou maior que 35 mm.

G 3 - Administração de 2.500 UI de hCG (Vetecor[®]), IM, no dia seguinte à ovulação (D1).

Resultados

Foi observado efeito do tempo em relação à concentração plasmática de progesterona (P<0,05). Os grupos tratados com hCG (G2 e G3) apresentaram no quarto dia pós-ovulação (D4) concentração plasmática de progesterona superior ao grupo controle (G1). Porém, os grupos tratados não diferiram (P>0,05) entre si (Tab. 3).

Tabela 3. Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 após a ovulação. Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão. Dia 0 = dia da ovulação.

Grupo	Dias				
	D0	D2	D4	D6	D8
G1	0,94 \pm 0,05	3,86 \pm 0,57	8,42 \pm 1,24 ^b	15,29 \pm 1,97	16,08 \pm 1,56
G2	1,12 \pm 0,05	5,65 \pm 0,47	16,01 \pm 1,27 ^a	19,87 \pm 1,86	16,08 \pm 1,62
G3	1,08 \pm 0,06	4,50 \pm 0,52	14,85 \pm 1,69 ^a	17,59 \pm 1,46	17,31 \pm 1,34

Letras diferentes na mesma coluna (a,b) mostram uma diferença significativa (p<0,05).

Quando o tônus uterino foi avaliado no D6, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (P>0,05), conforme observado na Tab. 4.

Apesar de não existir diferença estatística pode se observar que o G3 apresentou 32,14% das éguas com o tônus 4, enquanto os outros grupos apresentaram 10,71 (G2) e 7,14% (G1).

Quando se efetuou a soma dos escores de tônus uterino 1 e 2, o G1 apresentou 39,29% das éguas nesta classificação, enquanto que o G2 apresentou 46,43 e o G3, 21,43%.

Tabela 4. Porcentagem de éguas examinadas no D6 com escores de tônus uterino 1 (flácido), 2, 3 ou 4 (firme) entre os tratamentos.

Tratamentos	Tônus uterino			
	1 (n)	2 (n)	3 (n)	4 (n)
G1	17,86 (5)	21,43 (06)	53,57 (15)	07,14 (2)
G2	10,71 (3)	35,72 (10)	42,86 (12)	10,71 (3)
G3	00,00 (0)	21,43 (06)	46,43 (13)	32,14 (9)

Teste exato de Fisher P=0,0517

Foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais quanto à característica reprodutiva tônus cervical, conforme pode ser observado na Tab. 5.

O G3 demonstrou-se como o melhor tratamento para a característica tônus de cérvix, não apresentando éguas com tônus 1, enquanto o G1 apresentou 14,29% das éguas e o G2 3,57%. Ainda o G3 resultou em maior porcentagem média de éguas com tônus cervical 4 (28,57%), quando comparado com G1 (14,29%) e G2 (7,14%).

Quando se efetuou a soma dos escores de tônus cervical 3 e 4, a porcentagem de éguas foi de 46,43 para o G1, 46,43 para o G2 e 85,71% para o G3.

Tabela 5. Porcentagem de éguas examinadas no D6 com escores de tônus cervical 1 (flácido), 2, 3 ou 4 (firme) entre os tratamentos.

Tratamentos	Tônus cervical			
	1 (n)	2 (n)	3 (n)	4 (n)
G1	14,29 (4)	39,29 (11)	32,14 (09)	14,29 (4)
G2	03,57 (1)	50,00 (14)	39,29 (11)	07,14 (2)
G3	00,00 (0)	14,29 (04)	57,14 (16)	28,57 (8)

Teste exato de Fisher $P = 0,0087$

Não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados quanto a morfoecogenicidade uterina ($P > 0,05$). No entanto, quando se efetuou a soma dos escores nas categorias 1 e 2 pode ser observado que existiu uma diferença numérica entre os grupos que receberam o tratamento em comparação com o grupo controle sendo que no G1 foi observado 57,14%, 78,57% no G2 e 89,03% no G3.

Na categoria ordem de escolha da candidata a receptora, existiu diferença estatística significativa ($P < 0,05$), sendo apresentada na Tab. 6.

Devido a importância da ordem de escolha da candidata a receptora, apenas os animais de 1^a e 2^a escolha devem ser selecionados para receberem os embriões (animais com melhores características reprodutivas como receptoras de embriões). Deste modo, ao analisar cuidadosamente os dados e apenas considerar a existência de uma parcela de éguas aptas a receber o embrião e outras não aptas a receber, nota-se que as receptoras dos grupos tratados com hCG possuem um maior ($p < 0,05$) número de animais aptos a receber o embrião (Tab. 7).

Tabela 6. Porcentagem de éguas examinadas no D6 segundo a ordem de escolha 1^a (melhores características de diestro) 2^a, 3^a e 4^a (piores características de diestro) entre os tratamentos.

Tratamentos	Ordem de escolha da candidata a receptora			
	1 ^a (n)	2 ^a (n)	3 ^a (n)	4 ^a (n)
G1	21,43 (6)	35,71 (10)	39,29 (11)	3,57 (1)
G2	17,86 (5)	60,71 (17)	17,86 (05)	3,57 (1)
G3	32,14 (9)	57,16 (16)	10,71 (03)	0,00 (0)

Teste exato de Fisher $P = 0,0014$

Tabela 7. Efeito do tratamento no número de éguas aptas a receberem o embrião no 6^o dia após ovulação.

Grupo	Porcentagem de receptoras aptas
G1	15/28 (53,57) ^b
G2	23/28 (82,14) ^a
G3	24/28 (85,71) ^a

Letras diferentes (a,b) mostram uma diferença significativa ($p < 0,05$).

No experimento 1, o grupo tratado com hCG apresentou média superior na concentração plasmática de progesterona em relação aos outros grupos. No experimento 2 observou-se que a hCG parece antecipar a luteinização do CL, já que os animais tratados atingiram o platô (Tab. 3) médio de produção de P₄ antes dos animais do grupo controle. Estes resultados podem ser explicados pela ação luteotrófica da hCG, uma vez que ele promove uma mudança funcional no corpo lúteo com aumento do número de células luteais grandes, produtoras da maioria da progesterona secretada pelo corpo lúteo (Hansel e Blair, 1996). Estes resultados corroboram com estudo de Kelly *et al.* (1988) que adicionando LH ou hCG em células luteais equinas cultivadas

in vitro demonstraram um aumento significativo nas concentrações de progesterona.

Segundo Ginther (1992), ocorre um aumento no número de receptores para LH no corpo lúteo (21 vezes) e aumento na afinidade do receptor pelo LH (5 vezes) entre os dias 1 e 14 do ciclo estral na égua justificando assim a ação luteotrófica da hCG neste período.

De acordo com Newcombe *et al.* (2000), a hCG contribui para a prevenção do sinal luteolítico uma vez que ela promove o aumento da secreção de proteínas uterinas e da secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Estes achados, justificando o aumento numérico na taxa de prenhez encontrado no primeiro experimento. Acreditamos que estes resultados seriam significativos estatisticamente caso houvesse um maior número de éguas por tratamento.

No experimento 2, embora não constatada diferença estatística em relação ao tônus uterino, ocorreu uma tendência numérica para o grupo G3 (hCG no d1) onde uma maior porcentagem de éguas tiveram tônus uterino e cervical mais firmes. Segundo Carnevale *et al.* (2000) e Squires *et al.* (2003), éguas com tônus cervical e uterino mais tenso são as que devem ser selecionadas prioritariamente para receberem embrião, pois apresentam melhores índices de prenhez. E além disto, os grupos tratados com hCG, demonstraram maior porcentagem de receptoras aptas a receberem embriões (Tab. 7). Deste modo, verificou-se que a antecipação na maturação do CL, esta refletida na obtenção prematura do platô da concentração plasmática de progesterona, aumentou as chances das éguas apresentarem condições uterinas para receberem o embrião. Provavelmente este fato ocorra pelo aumento da exposição (em dias) do organismo aos efeitos do hormônio progesterona.

Podemos então concluir que, a hCG quando aplicada em fêmeas eqüinas, induz o aumento na produção de progesterona além de proporcionar maior porcentagem de éguas com características reprodutivas desejadas para a transferência de embriões. Este fato é notado na tendência de melhores taxas de prenhez nos grupos tratados com hCG, o que está de acordo com a melhora nos níveis de progesterona e nas características reprodutivas desejáveis. Portanto a hCG pode ser utilizada não só na indução da ovulação como também na melhoria das características reprodutivas das receptoras, possibilitando assim uma redução na relação doadora/receptora.

Referências

- Arruda RP, Visintin JA, Fleury, JJ, Garcia AR, Madureira, EH, Celeghini ECC, Neves Neto, JR. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos? *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.38, p.233-239, 2001.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Mccue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, p.965-979, 2000.
- Douglas RH. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology*, v.11, p.33-36, 1979.
- Fleury JJ, Alvarenga, MA, Costa Neto JBF, Papa FO. Transferência de embriões em eqüinos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.39, p.485-487, 1987.
- Ginther OJ, Bergfelt DR. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. *J Equine Vet Sci*, v.12, p.349-54, 1992.
- Hansel W, Blair RM. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, v.45, p.1267-1294, 1996.
- Kelly, CM, Hoyer PB, Wise ME. In-vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. *J Reprod Fertil*, v.84, p.593-600, 1988.
- Newcombe JR, Martinez TA, Peters AR. The effect of the gonadotropin-releasing hormone analog, busserelin, on pregnancy rates in horse and pony mares. *Theriogenology*, v. 55, p.1619-1631, 2001.
- Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in horses. *Theriogenology*, v.59, p.151-170, 2003.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 04/11463-2, 05/60591-6, 05/60592-2 e 06/60966-2).