

## Sincronização da Onda Follicular com hCG Prévia à Indução da Luteólise com Cloprostenol em Bovinos

Deiler Sampaio Costa<sup>1</sup>, Ciro Alexandre Alves Torres<sup>2</sup>, Libardo A. Maza Angulo<sup>1</sup>, Luiz Arthur C. Junqueira<sup>1</sup>, Luciano Andrade Silva<sup>3</sup>

**RESUMO** - O efeito da aplicação de diferentes doses de hCG sobre a emergência de nova onda de crescimento folicular e o número de folículos recrutados dessa onda, a formação de corpo lúteo acessório, o diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo espontâneo no dia da aplicação do luteolítico, a subsequente taxa de sincronização e o intervalo da aplicação de PGF<sub>2</sub>α à manifestação do estro foram avaliados. Vinte fêmeas bovinas mestiças em diestro, divididas em quatro tratamentos, contendo cinco animais cada, foram usadas. No tratamento 1, os animais receberam 500 UI I.M. hCG no dia 0, dia em que se iniciou o tratamento, e 150 µg D(+) cloprostenol no dia 6; já nos tratamentos 2, 3 e 4, receberam, respectivamente, 1000, 2000 e 3000 UI hCG, pela mesma via de aplicação, e 150 µg D(+) cloprostenol no dia 6. A atividade ovariana foi monitorada diariamente, com auxílio do aparelho de ultra-sonografia, do dia 0 ao estro, ou até o dia 11 após o tratamento, nos animais que não responderam à prostaglandina. Não houve diferença entre os efeitos de 500, 1000, 2000 e 3000 UI hCG sobre a dinâmica folicular, a taxa de sincronização e o intervalo da aplicação de PGF<sub>2</sub>α ao estro. Houve, no entanto, tendência de as dosagens de 2000 e 3000 UI induzirem à emergência de nova onda de crescimento folicular mais rapidamente que 500 ou 1000 UI destes hormônios.

Palavras-chave: dinâmica folicular, hCG, cloprostenol, sincronização do estro, bovinos

## Follicular Wave Synchronization with hCG prior the Luteolysis Induction with Cloprostenol in Cattle

**ABSTRACT** - The effect of different doses of hCG administration on the emergence of a new follicular growth wave and the number of recruited follicles from this wave, the accessory corpus luteum formation, the diameter of the dominant follicle and of the spontaneous corpus luteum on the day of a luteolytic administration and subsequent synchronization rate and the interval between the PGF<sub>2</sub>α administration and the estrus manifestation were evaluated. Twenty crossbred female cattle in diestrus, divided in four treatments containing five animals each were used. In treatment 1, the animals received 500 IU IM of hCG on day 0 (day which started the treatment) and 150 µg of D(+) Cloprostenol on day 6. In treatments 2, 3 and 4, the animals received 1000, 2000 and 3000 IU, respectively, on day 0 and 150 µg of D(+) Cloprostenol on day 6. The ovarian activity was monitored daily, with the help of an ultra-sound apparatus, from day 0 to the estrus, or up to day 11 after the treatment on those animals which did not response to prostaglandin. There were no significant differences among the effects of 500, 1000, 2000 and 3000 IU of hCG on the follicular dynamic, synchronization rate and the interval between the PGF<sub>2</sub>α and the estrus manifestation. There was, however, a tendency of 2000 and 3000 IU doses to induce an emergence of a new follicular growth wave faster than 500 or 1000 IU of these hormones.

Key Words: follicular dynamic, hCG, Cloprostenol, estrus synchronization, cattle

### Introdução

A propriedade luteotrópica da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), semelhante ao hormônio luteotrópico (LH) *in vivo*, tem sido demonstrada em vários estudos (DONALDSON e HANSEL, 1965; VEENHUIZEN et al., 1972). Segundo FARIN et al. (1988), a administração de hCG aumenta o número de células luteais grandes, associada a decréscimo concomitante de células luteais pequenas. Administrado por via intramuscular, esse hormônio persiste

por longo período no organismo animal, sendo detectado no plasma sanguíneo de novilhas 66 horas após sua aplicação (SCHMITT et al., 1996 a). Na fase luteal do ciclo estral, aumenta a concentração sérica de progesterona (HELMER e BRITT, 1987; SHIPLEY et al., 1988) e prolonga a duração do ciclo estral por, aproximadamente, cinco dias (EDUVIE e SEGUIN, 1982; MACMILLAN et al., 1986). Por sua vez, tratamentos antes do dia 7 ou depois do dia 17 do ciclo estral não influem na duração desse ciclo (HELMER e BRITT, 1986).

<sup>1</sup> Mestre em Zootecnia, UFV.

<sup>2</sup> Professor Titular, UFV.

<sup>3</sup> Graduando em Medicina Veterinária, UFV.

Os folículos ovarianos grandes, durante a fase luteal, são capazes de ovular em resposta à administração de hCG e formar corpo lúteo acessório (PRICE e WEBB, 1989; FRICKE et al., 1993; e SCHMITT et al., 1996b). A remoção do efeito supressivo do folículo dominante pela ovulação induzida pelo hCG criou ambiente permissivo para a emergência de nova onda folicular (SIANANGAMA e RAJAMAHEDRAN, 1996).

O corpo lúteo acessório, formado após o tratamento com hCG durante a fase luteal, pode sofrer luteólise em resposta à  $\text{PGF}_2\alpha$ , durante os cinco primeiros dias após a ovulação (HOWARD e BRITT, 1990). Esses autores reportam, ainda, que novilhas que receberam  $\text{PGF}_2\alpha$ , seis dias após a aplicação de hCG, tiveram luteólise imediata, com níveis de progesterona caindo a  $< 0,1$  ng/mL em 24 horas. Todos os animais desse grupo exibiram estro em dois ou três dias, apresentando resposta típica à aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  entre os dias 5 e 16 do ciclo estral.

Objetivou-se, com este experimento, verificar o efeito de diferentes doses de hCG sobre o dia de emergência da nova onda folicular, o número de folículos recrutados dessa onda, o diâmetro do folículo dominante no sexto dia após o tratamento hormonal, o diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia do estro após aplicação de luteolítico, o diâmetro do corpo lúteo espontâneo no dia seis, a formação de corpo lúteo acessório, a taxa de sincronização do estro e o intervalo da aplicação da  $\text{PGF}_2\alpha$  à manifestação do estro.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências da Fazenda Casa Nova, sediada no município de Araçuaia, Minas Gerais, no mês de janeiro de 1996. Foram utilizadas 20 fêmeas bovinas mestiças Holandês x Zebu e Simental x Zebu (12 vacas secas e 8 novilhas) em diestro, com peso vivo acima de 300 kg, escore corporal de, pelo menos, 3,0 (FERGUSON e OTTO, 1989), ciclando regularmente e não apresentando anormalidades nos órgãos genitais, detectáveis ao exame ginecológico.

Constituíram-se quatro tratamentos contendo cinco animais cada (três vacas secas e duas novilhas): no tratamento 1, os animais receberam 500 UI Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), por via intramuscular (IM), no dia 0 (dia em que se iniciou o experimento), e 150 mg IM de D(+) cloprostenol no dia 6; nos tratamentos 2, 3 e 4, os animais receberam, respectivamente, 1000, 2000 e 3000 UI hCG no dia 0 e 150 mg de D(+) cloprostenol no dia 6. Todas as

doses perfizeram volume total de 2 mL. Quando necessário, era adicionada solução aquosa estéril em quantidade suficiente para completar esse volume.

A atividade ovariana foi monitorada diariamente, pela manhã, do dia 0 ao dia do estro, ou até o dia 11 pós-tratamento, nos animais que não responderam à prostaglandina. Os ovários foram monitorados, via retal, com auxílio de um transdutor linear de 5,0 MHz, sendo as imagens dos folículos e dos corpos lúteos observadas na tela do aparelho de ultra-som ALOKA SSD 500. Os folículos foram mapeados e seus diâmetros medidos após o congelamento da imagem mais representativa de cada estrutura. O diâmetro do corpo lúteo foi calculado pela maior distância entre suas bordas. Todos os exames foram gravados em vídeo-cassete e as imagens reexaminadas ao final do experimento, conferindo-se todas as medidas.

As observações visuais de estro foram feitas diariamente até o dia 6, nos horários de 6 às 8 h e 17 às 19 h, e, a partir do dia 6, ininterruptamente, de 5 às 22 h, sendo auxiliadas pelo uso de um rufião e uma fêmea androgenizada portando buçal marcador. Registrou-se a hora em que o estro começou, ou seja, quando os animais apresentaram reflexo de imobilização à monta.

As amostras de sangue foram coletadas em todos os animais nos dias 0, 6 e no dia do estro, utilizando-se tubos vacuolizados para punção da veia ou artéria coccígeas, sendo mantidos em temperatura ambiente por 60 a 120 minutos, quando, então, foram centrifugadas a 3.000 rpm, durante 15 minutos, e o soro obtido foi armazenado em "freezer" a  $-18^\circ\text{C}$ , até o dia da análise da progesterona sérica. As concentrações séricas de progesterona foram dosadas por radioimunoensaio em fase sólida com o uso de kit comercial.

Foi usado delineamento inteiramente casualizado. As variáveis número de folículos recrutados da nova onda folicular, número de animais com corpo lúteo acessório, diâmetro do folículo dominante e do corpo lúteo espontâneo no dia 6, diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia do estro, intervalo da aplicação da  $\text{PGF}_2\alpha$  e ao estro e o dia da emergência da nova onda folicular foram estudadas pela análise de regressão linear, admitindo-se nível de 5% de probabilidade.

### Resultados e Discussão

A média do peso vivo dos animais utilizados neste experimento foi 450,3 kg (343 a 535); a variação do escore corporal, 3,0 a 4,5; e a concentração sérica de progesterona no dia zero,  $\geq 1,0$  ng/mL (Tabela 1), sugerindo que todos estavam ciclando e na fase de diestro.

A administração das diferentes doses de hCG no dia zero parece ter sido eficiente para inibir a não-manifestação de estro espontâneo entre o dia 1 e 6, o que pode ser atribuído à luteinização folicular causada por esse hormônio, que possui ação semelhante ao LH (VEENHUIZEN et al., 1972; HARDIN e RANDEL, 1982). Efeito semelhante foi observado por TWAGIRAMUNGO et al. (1992 a,b), utilizando o potente análogo de GnRH, busserelina.

Apenas um animal que recebeu 2000 UI de hCG tinha ovulado no dia 1 (Tabela 2), confirmando o efeito citado anteriormente por FRICKE et al. (1993) e PRICE e WEBB (1989). Nesse caso, houve formação de corpo lúteo acessório, que foi detectado no dia 2, semelhante ao resultado obtido por HOWARD e BRITT (1990). Esse corpo lúteo regrediu em resposta à aplicação do luteolítico no dia 6, conforme reportado previamente por SCOTT e BRITT (1986), indicando que nesse dia tal estrutura já possuía receptores suficientes para PGF<sub>2</sub>α.

A indeterminação do dia do diestro em que os animais se encontravam, visto que um único exame ultra-sonográfico no dia zero é insuficiente para prever o estágio de desenvolvimento folicular (BO et al., 1995), sugere que a ocorrência de ovulação e posterior formação de corpo lúteo acessório não pode ser atribuída ao efeito específico da dose aplicada, mas um achado do acaso.

Houve emergência de nova onda de crescimento folicular entre os dias 1 e 6, em todos os animais que receberam 3000 UI e em quatro dos cinco animais que receberam 500, 1000 ou 2000 UI (Tabela 2), respectivamente. O presente estudo não permite atribuir tal ocorrência à aplicação hormonal, pois essa observação pode ter sido casualidade, em virtude da alta variabilidade observada nos dias de emergência entre os animais do mesmo tratamento. No entanto, observou-se tendência de os grupos que receberam doses de 2000 e 3000 UI apresentarem emergência

folicular em intervalo de tempo mais curto, quando comparado com os animais que receberam 500 ou 1.000 UI (Figura 1).

Apesar de não ter sido analisado neste estudo, parece que o hCG tem maior efeito sobre o corpo lúteo que sobre os folículos, exceto quando estes estão no período de dominância funcional. Estas observações, também, foram feitas por SHIPLEY et al. (1988) e BREUEL et al. (1988). Não obstante, em virtude de o efeito luteotrópico do hCG sobre o corpo lúteo aumentar a proporção de células luteais grandes e por estas possuírem maior proporção de receptores para PGF<sub>2</sub>α (NISWENDER et al., 1985), aumentando, assim, o potencial para sensibilidade a esse luteolítico (SIANANGAMA e RAJAMAHEDRAN, 1996), no presente estudo, não houve diferença na taxa de sincronização de estro entre os animais dos tratamentos, provavelmente, por causa do pequeno número de animais utilizados (Tabela 2).

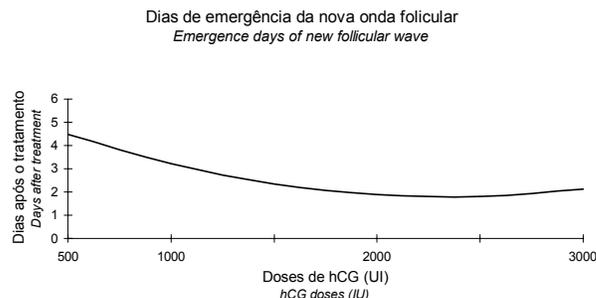


Figura 1 - Dias de emergência da nova onda folicular após o tratamento com diferentes doses de hCG.  $\hat{Y} = 6,128 - 0,0037D + 0,00000079D^2$  ( $P=0,33$ )  $R^2 = 0,9799$ .

Figure 1 - Emergence days of new follicular wave after treatment with different hCG doses.  $\hat{Y} = 6.128 - 0.0037D + 0.00000079D^2$  ( $P=0,33$ );  $R^2 = 0.9799$ .

Tabela 1 - Concentração sérica média e amplitude de progesterona, nos dias 0 (dia em que iniciou o tratamento), 6 e no dia do estro, dos animais que receberam diferentes doses de hCG

Table 1 - Amplitude and progesterone seric concentration at day 0 (the beginning of the experiment), 6 and estrus day of animals receiving different hCG doses

Dose de hCG (UI) hCG dose (IU)	Concentração de progesterona (ng/mL) Progesterone concentration (ng/mL)		
	Dia 0 Day 0	Dia 6 Day 6	Dia do estro Estrus day
	500	5,37(3,4-7,0)	5,72(3,0-5,7)
1000	2,80(1,0-6,0)	3,12(1,7-4,7)	0,20(0,1-0,2)
2000	7,04(1,6-9,8)	7,66(1,2-8,5)	0,12(0,1-0,2)
3000	7,35(3,2-9,8)	5,00(1,2-10)	0,45(0,4-0,5)

O folículo presente no dia da aplicação do luteolítico foi o mesmo folículo pré-ovulatório do dia do estro nos animais que apresentaram emergência de nova onda folicular entre os dias 1 e 6, como reportado previamente por FORTUNE (1993) e SAVIO et al. (1990). Apesar da sincronização do crescimento folicular observada, não houve diferença na distribuição da manifestação estro entre os tratamentos (Figura 2).

O número de folículos recrutados da nova onda, o diâmetro do folículo dominante no dia 6 e do folículo pré-ovulatório no dia do estro, o diâmetro do corpo lúteo espontâneo no dia 6, a formação de corpo lúteo acessório, a taxa de sincronização de estro e o intervalo da aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  ao estro (Tabela 2) foram semelhantes entre as diferentes doses de hCG.

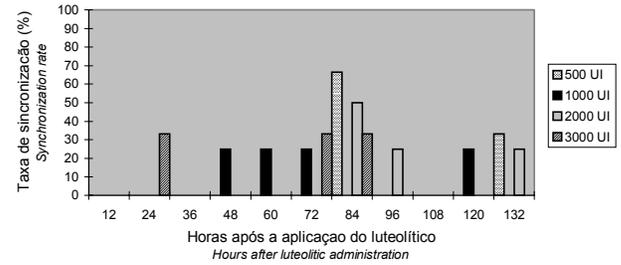


Figura 2 - Distribuição do estro, a cada 12 horas, após a aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  no dia seis, precedida de diferentes doses de hCG no dia 0 (dia em que se iniciou o tratamento).

Figure 2 - Estrus distribution, in 12-12 hours, after  $\text{PGF}_2\alpha$  administration at day 6, precede of different hCG doses at day 0 (the beginning of the experiment).

Tabela 2 - Dinâmica folicular, diâmetro do corpo lúteo espontâneo, formação de corpo lúteo acessório, taxa de sincronização e intervalo da aplicação da  $\text{PGF}_2\alpha$  ao estro de animais tratados com diferentes doses de hCG

Table 2 - Follicular dynamic, spontaneous corpus luteum diameter, accessory corpus luteum formation, synchronization rate and time interval from  $\text{PGF}_2\alpha$  to onset of estrus of treated animals with different hCG doses

Item	Dose de hCG (UI)			
	hCG dose (IU)			
	500	1.000	2.000	3.000
Número de animais <i>Number of animals</i>	5	5	5	5
Nº de animais com emergência de nova onda folicular do dia 1 ao 6 <i>N. of animals with new follicular wave emergence from day 1 to 6</i>	4	4	4	5
Nº de folículos recrutados da nova onda (> 4mm) <i>Number of recruited follicles of new wave</i>	3,00+0,81*	3,00+0,81*	3,75+0,95*	2,33+0,57*
Diâmetro do folículo dominante no dia 6 (cm) <i>Dominant follicle diameter at day 6 (cm)</i>	1,07+0,37*	1,21+0,27*	1,11+0,27*	0,71+0,16*
Diâmetro do folículo pré-ovulatório no estro (cm) <i>Pre ovulatory follicle diameter at estrus (cm)</i>	1,33+0,44*	1,26+0,29*	1,46+0,18*	1,05+0,12*
Diâmetro do CL espontâneo no dia 6 (cm) <i>Spontaneous CL diameter at day 6 (cm)</i>	2,52+0,57*	2,64+0,62*	2,56+0,62*	2,48+0,85*
Nº de animais com CL acessório no dia 6 <i>Number of animals with accessory CL at day 6</i>	0	0	1	0
Taxa de sincronização do estro (%) <i>Estrus synchronization rate</i>	60(3/5)	80(4/5)	80(4/5)	60(3/5)
Intervalo da aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ ao estro (horas) <i>Time interval from <math>\text{PGF}_2\alpha</math> onset of estrus (hours)</i>	93,75+27,42*	70,89+31,68*	93,81+23,21*	56,90+31,46*

\* Regressão linear não-significativa ( $P>0,05$ ).

\* Linear Regression no significant ( $P>.05$ ).

## Conclusões

As diferentes dosagens de hCG não alteraram a dinâmica folicular e a taxa de sincronização do estro.

## Referências Bibliográficas

- BO, G.A., ADAMS, G. P., PIERSON, R.A. et al. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43:31-40.
- BREUEL, K.F., SPITZER, J.C., GIMENEZ, T. et al. 1988. Effect of holding time and temperature of bovine whole blood on concentration of progesterone, estradiol-17 and estrone in plasma serum samples. *Theriogenology*, 30:613.
- DONALDSON, L.E., HANSEL, W. 1965. Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone. *J. Dairy. Sci.*, 67:903-909.
- EDUVIE, L.O., SEGUIN, B.E. 1982. Corpus luteum function and pregnancy rate in lactating dairy cows given human chorionic gonadotropin at middiestrus. *Theriogenology*, 17:415-422.
- FARIN, C.E., MOELLER, C.L., MAYAN, H. et al. 1988. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, 38:413-421.
- FERGUSON, J.D., OTTO, K.A. 1989. Managing body condition in dairy cows. *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.*, p.75-87.
- FORTUNE, J.E. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, 33:111-125.
- FRICKE, P.M., REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. 1993. Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. *J. Anim. Sci.*, 71:1242-1246.
- HARDIN, D.R., RANDEL, R.D. 1982. The effect of cloprostenol and cloprostenol plus hCG on corpora lutea and serum progesterone in Brahman cows. *Theriogenology*, 17:669-675.
- HELMER, S.D., BRITT, J.H. 1986. Fertility of dairy cattle treated with human chorionic gonadotropin (hCG) to stimulate progesterone secretion. *Theriogenology*, 26:683-695.
- HELMER, S.D., BRITT, J.H. 1987. Hormone secretion and characteristics of estrous cycles after treatment of heifers with human gonadotropin or prostaglandin F<sub>2a</sub> during corpus luteum formation. *J. Anim. Sci.*, 64:782-789.
- HOWARD, H.J., BRITT, J.H. 1990. Prostaglandin F-2a causes regression of an hCG-induced corpus luteum before day 5 of its lifespan in cattle. *J.Reprod.Fert.*, 90:245-253.
- MACMILLAN, K.L., TAUFU, V.K., DAY, A.M. 1986. Effect of na agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) in cattle. III pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, 11:1-10.
- NISWENDER, G.D., SCHWALL, R.H., FITZ, C.E. et al. 1985. Regulation of luteal function indomestic ruminants: new concepts. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 41:101-151.
- PRICE, C.A., WEBB, R. 1989. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 86:303-308.
- SAVIO, J.P., BOLAND, M.P., HYNES, N., et al. 1990. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7? *Theriogenology*, 33:677-687.
- SCHMITT, É.J.P., DIAZ, T., DROST, M. et al. 1996a. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.*, 74:1084-1091.
- SCHMITT, É.J.P., BARROS, C.M., FIELDS, P.A. et al. 1996 b. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 74:1915-1929.
- SCOTT, R.G., BRITT, J.H. 1986. Effect of estradiol, oxytocin and PGF on progesterone secretion in cows given hCG during diestrus. *J. Dairy Sci.*, 69:168 (abstr).
- SHIPLEY, S.K., FUGUAY, J.W., SMITH, A.E. et al. 1988. Response of dairy heifers to prostaglandin F<sub>2a</sub> after treatment with human chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 29:743-749.
- SIANGANGAMA, P.C., RAJAMAHEDRAN, R. 1996. Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. *Theriogenology*, 45:583-592.
- TWAGIRAMUNGO, H., GUILBAULT, L.A., PROULX, J. et al. 1992a. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology*, 38:1131-1144.
- TWAGIRAMUNGO, H., GUILBAULT, L.A., PROULX, J. et al. 1992b. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.*, 70:1904-1910.
- VEENHUIZEN, E.L., WAGNER, J.F., TONKINSON, L.V. 1972. Corpus luteum response to 6-chloro D<sup>6</sup>-17 acetoxypregesterone and hCG in the cow. *Biol. Reprod.*, 6:270-276.

Recebido em: 08/01/97

Aceito em: 07/11/98