

GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA. PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RESPOSTA OVARIANA EM OVINOS E SUÍNOS¹

EQUINE CHORIONIC GONADOTROPHIN. PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND OVARIAN ACTIVITY IN EWES AND GILTS

José Antonio Guimarães Aleixo² João Carlos Deschamps³ Vilceu Bordignon⁴
Cláudio Alves Pimentel² José Carlos Ferrugem Moraes⁵

RESUMO

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) foi purificada e caracterizada com respeito ao grau de pureza e atividade biológica. A pureza de quatro preparações foi determinada por eletroforese e a atividade biológica pelo incremento do peso ovariano de ratas imaturas (40 - 50g) e pela indução de ovulação em ovelhas e leitoas. A análise eletroforética revelou a presença de três bandas polipeptídicas. A atividade biológica média foi de 313 UI/mg de proteína. Sessenta e cinco (65) ovelhas, fora da estação reprodutiva, foram divididas ao acaso em dois grupos os quais receberam implantes vaginais de esponjas impregnadas com acetato de medroxiprogesterona por um período de 11 a 14 dias. No grupo I (55 ovelhas), foram injetadas (IM) 500UI do eCG purificado no momento da retirada das esponjas, enquanto que no grupo II (10 ovelhas) foram

injetadas 500UI de eCG comercial. Uma semana após a aplicação do eCG as ovelhas foram submetidas a um exame laparoscópico para avaliar o número de ovulações. Obteve-se uma média de $2,1 \pm 0,3$ e $1,8 \pm 0,3$ ovulações ($P > 0,05$) para as ovelhas dos grupos I e II, respectivamente. De 120 leitoas pré-púberes, com peso médio de 87,2kg, 90 (grupo I) foram injetadas com 500UI do eCG purificado e, às 72 horas, 500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana), e 30 leitoas (grupo II) não receberam injeção hormonal. Observou-se a presença de $25,9 \pm 22,2$ e $0,0$ *corpora lutea* ($P < 0,001$), nos grupos I e II, respectivamente. Estes resultados demonstraram que o PMSG purificado apresenta pureza e atividade biológica similares ao produto comercial utilizado como controle e que é eficiente para induzir atividade ovariana em ovinos e suínos.

Palavras-chave: eCG, PMSG, purificação, ovulação.

¹Trabalho financiado pelo CNPq (Proc. 502531/91-6) e FAPERGS (Proc. 495/90).

²Médico Veterinário, PhD, Professor Titular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 96010-900 Pelotas, RS. Autor para correspondência.

³Médico Veterinário, PhD, Professor Adjunto, Centro de Biotecnologia, UFPel.

⁴Médico Veterinário, MSc, Bolsista FAPERGS, Centro de Biotecnologia, UFPel.

⁵Médico Veterinário, Doutor, Pesquisador da EMBRAPA - CPPSUL, 96400-970 Bagé, RS.

SUMMARY

Equine chorionic gonadotrophin (eCG) was purified and characterized with respect to its purity and biological activity. The purity of four preparations was determined by electrophoresis, and the biological activity by increasing of the ovarian weight of immature female rats (40-50g) and induction of ovulation of ewes and gilts. Electrophoretic analysis revealed three polipeptidic bands. The mean biological activity was 313UI/mg of protein. Sixty-five ewes, not in reproductive season, were divided randomly in two groups that received vaginal pessaries impregnated with medroxyprogesterone acetate for 11 to 14 days. In treatment I, ewes (n = 55) were injected (IM) with 500UI of purified eCG at the moment of pessaries withdraw, while in treatment II, the ewes (n = 10) received 500UI of comercial eCG. The results observed were 2.1 ± 0.3 and 1.8 ± 0.3 ovulations ($P > 0.05$) for treatments I and II, respectively. One hundred-twenty gilts, with mean weight of 87.2kg, were divided in two treatments. The animals in treatment I (90 gilts) received 500UI of purified eCG and, 72 hours later, 500UI of hCG (human chorionic gonadotrophin). In treatment II hormones were not injected. The results observed were 25.9 ± 22.2 and 0.0 *corpora lutea* ($P < 0.001$) for treatments I and II, respectively. These results demonstrated that the eCG purified has purity and biological activity similar to the comercial product used as control, and that it is efficient in inducing ovarian activity in ewes and gilts.

Key words: eCG, PMSG, purification, ovulation.

INTRODUÇÃO

O hormônio eCG (gonadotrofina coriônica eqüina), também denominado PMSG (gonadotrofina do soro de égua gestante), é uma glicoproteína produzida pelos cálices endometriais de éguas, notadamente entre os 40 e 120 dias de gestação (GINTHER, 1979). Em relação a outros hormônios gonadotróficos, o eCG apresenta a singularidade de possuir atividade foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) na mesma molécula (PAPKOFF, 1974). Devido a esta propriedade, está muito difundindo o uso do eCG para a manipulação do ciclo estral e indução de superovulação em várias espécies de importância econômica, principalmente em ovinos e suínos.

Na espécie ovina, o eCG vem sendo usado em conjunto com pessários vaginais impregnados com progesterona para induzir e sincronizar o cio fora da estação reprodutiva convencional e/ou durante o anestro lactacional (ACRITOPULOU-FOURCROY et al., 1982; SCARAMUZZI et al., 1988; LUZ et al., 1989; RAJAMAHENDRAN et al., 1992). Assim, como o período de acasalamento pode ser reduzido para menos de quatro semanas, um ciclo reprodutivo completo pode ser concluído em 190-200 dias (MORAES, 1991).

Em suínos, granjas que utilizam eCG em conjunto com hCG (gonadotrofina coriônica humana) em programas reprodutivos controlados, apresentam índices de fertilidade superiores aos de granjas que usam sistemas convencionais de reprodução (HUHN & KONIG, 1989).

No Brasil, o uso desta tecnologia tem sido prejudicado pelo fato de o eCG encontrado no mercado brasileiro ser todo importado e freqüentemente apresentar uma eficiência biológica de apenas 50% daquela existente no produto análogo estrangeiro (GREGORY & RODRIGUES, 1985). A disponibilidade de um produto nacional de boa qualidade e preço acessível facilitará ao produtor a adoção de novas tecnologias reprodutivas para seus rebanhos.

Com o objetivo de suprir esta demanda foram iniciados estudos no Centro de Biotecnologia (Cenbiot) da UFPEL com vistas à produção de eCG. Neste trabalho se descreve a metodologia de purificação do eCG em escala de laboratório, a caracterização do produto obtido quanto à pureza e potência biológica, e a sua eficiência na indução de atividade ovariana em ovinos e suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtensão do plasma

Sangue de éguas entre 60 e 90 dias de gestação foi coletado em frascos contendo EDTA suficiente para obter uma concentração de 1g/l e deixado por aproximadamente 12h a 4°C para sedimentação celular. Após decantação do plasma, uma alíquota foi separada para determinação da presença de PMSG pelo método descrito abaixo e o restante congelado a -20°C para posterior purificação do hormônio.

Purificação do hormônio

Foi utilizada a metodologia básica proposta por GOSPODAROWICZ & PAPKOFF (1967). Inicialmente, quantidades de aproximadamente 1 litro de plasma foram acidificadas até pH 3,0 com ácido metafosfórico 0,5M. O precipitado formado foi removido por centrifugação a 8000 g por 15 min. Depois de ajustar o pH do sobrenadante a 4,5 com NaOH 1N, adicionou-se igual volume de etanol resfriado a -20°C. Fez-se nova centrifugação para remover o precipitado e adicionou-se igual volume de etanol ao sobrenadante. Após repouso de aproximadamente 12h a 4°C, o precipitado foi recolhido por centrifugação, dissolvido em água destilada e concentrado e dializado contra água em um sistema de vácuo-diálise (SCHLEIF & WENSINK, 1981). A seguir, misturou-se partes iguais do hormônio concentrado e de suporte de liofilização. Depois de liofilizado, o produto foi mantido sob refrigeração. As duas etapas finais do método original, cromatografias de filtração em gel e de troca iônica, foram omitidas em nossa rotina.

Caracterização do produto

A concentração de proteína nas preparações de eCG foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O grau de pureza das preparações foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). A atividade (potência) biológica foi determinada pela comparação do incremento do peso dos ovários de ratas imaturas (40 a 50g) injetadas com as diversas preparações do hormônio e com o padrão biológico internacional do eCG adquirido do National Institute for Biological Standards, England (COLE & ERWAY, 1941; BANGHAM & WOODWARD, 1966).

Atividade biológica em ovinos e suínos

Sessenta e cinco ovelhas, fora da estação reprodutiva, foram divididas ao acaso em dois grupos que receberam implantes vaginais de esponjas impregnadas com acetato de medroxiprogesterona por um período de 11 a 14 dias. Cinquenta e cinco ovelhas (grupo I) foram injetadas (IM) com 500UI do eCG purificado e 10 ovelhas (grupo II) foram injetadas com 500UI de eCG comercial (Folligon - Intervet, França). As injeções de eCG foram feitas no momento da retirada das esponjas. Uma semana após a aplicação do eCG as ovelhas foram submetidas a um exame laparoscópico para avaliar o número de ovulações.

Para a avaliação da atividade biológica em suínos foram utilizadas 120 leitoas, em fase final de terminação, com peso médio de $87,2 \pm 7,4$ kg. Estas leitoas foram divididas ao acaso em dois grupos. Noventa leitoas (grupo I) foram injetadas (IM) com 750UI de eCG purificado e, 72 horas após, 500UI de hCG. As leitoas foram abatidas 4 a 5 dias após a aplicação do hCG e os ovários foram coletados para se avaliar o número de *corpora lutea* por leitoa. Trinta leitoas (grupo II) não receberam injeção de eCG e serviram como controle, sendo os animais abatidos juntamente com os do Grupo I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Informações relativas aos plasmas utilizados e aos rendimentos obtidos em quatro preparações de eCG são mostrados na Tabela 1. A quantidade de eCG recuperado variou entre 25 e 31% daquela presente inicialmente no plasma. A atividade (potência) biológica média das quatro preparações foi de 313UI/mg de proteína. Este rendimento foi menor do que o obtido por GOSPODAROWICZ & PAPKOFF (1967) quando descreveram o método original de purificação, qual seja, 50 a 80% de recuperação e atividade biológica média de 638UI/mg para o eCG obtido na etapa de precipitação com 75% de etanol. O menor rendimento de

eCG obtido neste trabalho pode ter sido devido ao uso de plasma com atividade biológica mais baixa do que no método original (65 a 93UI/mg e 100 a 140UI/mg, respectivamente), ou a perdas no processo de extração. Por outro lado, a potência média de nossas preparações foi cerca de quinze vezes superior aquela obtida por WENTZ et al. (1991).

Tabela 1 - Rendimentos obtidos em quatro preparações de eCG.

Preparação	Plasma		eCG				
	Dias de gestação	Volume processado (l)	Atividade biológica (UI/ml)	Proteína recuperada (mg)	Potência biológica (UI/mg)	Rendimento (UI)	Recuperação (%)
1	58	1,5	72	74	399	29526	27
2	85	1,5	65	105	280	29400	30
3	65	1,2	93	98	258	25284	25
4	72	0,9	89	79	315	24885	31

O resultado da análise eletroforética das quatro preparações é mostrado na Figura 1. A coluna 1 contém diferentes polipeptídeos que servem como padrões de pesos moleculares. As colunas 2, 3, e 4 mostram bandas de polipeptídeos presentes em diferentes etapas da purificação. Nas colunas 5 a 8, referentes às preparações do hormônio foram observadas três bandas polipeptídicas, com a mais forte situando-se aproximadamente na altura de 43kDa correspondente ao peso molecular da subunidade alfa de eCG (CHRISTAKOS & BAHL, 1979). As duas bandas mais lentas são de proteínas que precipitam juntas com o eCG na concentração de 75% de etanol. Não se observa no gel a banda correspondente à subunidade beta que possui peso molecular de 16,9kDa (CHRISTAKOS & BAHL, 1979). Embora o grau de pureza das preparações examinadas não seja o mesmo do padrão internacional do hormônio, é similar ao do produto comercial disponível e ao obtido por GOSPODAROWICZ & PAPKOFF (1967).

O número de ovulações em ovelhas fora da estação reprodutiva foi de $2,1 \pm 0,3$ e $1,8 \pm 0,3$ ($P > 0,05$) para o eCG purificado (grupo I) e comercial (grupo II) respectivamente. Estes resultados demonstram que o eCG purificado pode ser utilizado em conjunto com pessários vaginais impregnados com progesterona para induzir e sincronizar o cio fora da estação reprodutiva convencional

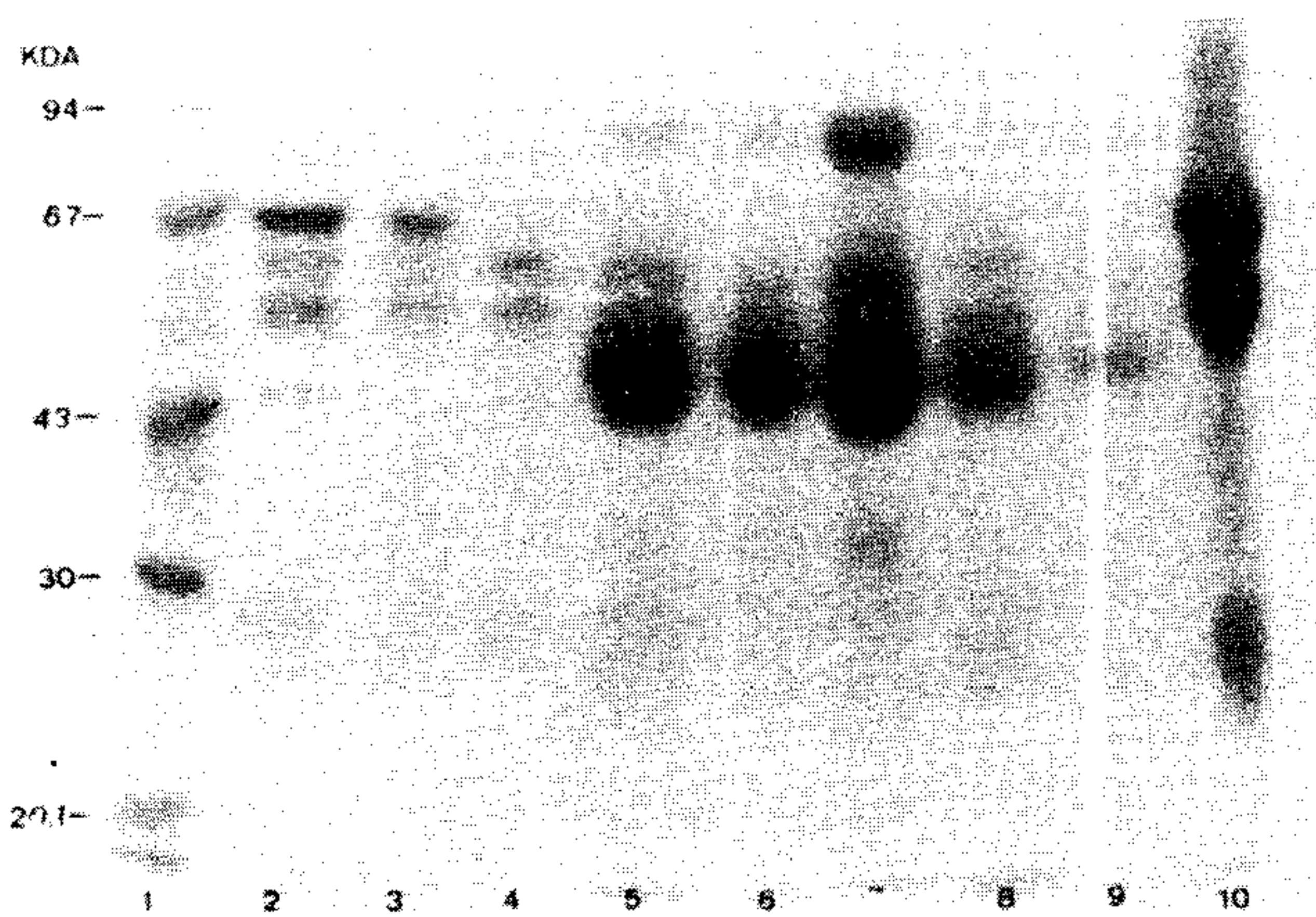


Figura 1. Análise eletroforética de quatro preparações de PMSG em gel de poliacrilamida com SDS.

- Coluna 1: padrões de peso molecular (10µg);
 Coluna 2: soro eqüino completo (20µg);
 Coluna 3: proteínas precipitadas por acidificação (20µg);
 Coluna 4: proteínas precipitadas com 50% de etanol (20µg);
 Coluna 5-8: proteínas precipitadas com 75% de etanol (50µg);
 Coluna 9: padrão de PMSG britânico (10µg);
 Coluna 10: eCG comercial (50 µg).

Na avaliação da atividade biológica em leitoas pré-púberes, foi obtido um número médio de $25,9 \pm 22,2$ e $0,0$ ($P < 0,001$) corpora lutea por leitoa no grupo injetado com o eCG purificado (grupo I) e nas leitoas controle (grupo II), respectivamente. Por outro lado, LISING et al. (1991) obtiveram $15,9 \pm 1,1$ *corpora lutea* ao injetarem 750UI de eCG em leitoas pré-púberes, enquanto que HOLTERSHINKEN (1992) injetou 1000 ou 1500UI por leitoa e verificou a presença de $32,8 \pm 17,0$ *corpora lutea* nos ovários. Esta variação na quantidade de *corpora lutea* observada entre os três trabalhos possivelmente é devida ao eCG utilizado e às diferentes condições a que estavam submetidos os animais.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o eCG purificado no Cenbiot apresenta pureza e atividade biológica similares ao produto comercial utilizado como controle e que é eficiente para induzir atividade ovariana em ovinos e suínos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRITOPULOU-FOURCROY, S., PAPPAS, V., PECLARIS, G. et al. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin $F_{2\alpha}$, or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nutr Develop*, v. 22, n. 2, p. 345-354, 1982.
- BANGHAM, D.R., WOODWARD, P.M. The second international standard for serum gonadotrophin. *Bull Wld Hlth Org*, v. 35, p. 761-773, 1966.
- CHRISTAKOS, S., BAHL, O.M. Pregnant mare serum gonadotrophin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. *J Biol Chem*, v. 254, p. 4253-4261, 1979.
- COLE, H.H., ERWAY, J. 48 hour assay test for equine gonadotropin with results expressed in international units. *Endocrinol*, v. 29, p. 514-519, 1941.
- GHINTER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare*. Ann Arbor: McNaughton and Gunn, 1979, 413 p.
- GOSPODAROWICZ, D., PAPKOFF, H. A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin. *Endocrinol*, v. 80, p. 699-702, 1967.
- GREGORY, R.M., RODRIGUES, J.L. Comparação dos tratamentos superovulatórios com FSH e PMSG em vacas Hereford. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1985, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1985. p. 374.
- HOLTERSHINKEN, B. Analysis of factors affecting the response to superovulation and embryo quality in prepubertal gilts. *Pig News and Information*, v. 13, p. 310, 1992.
- HUHN, U., KONIG, I. Biotechnical control of reproduction in pigs. *Pig News and Information*, v. 10, p. 173-176, 1989.
- LAEMMLI, E.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LISING, R.T., CAMERON, R.D.A., BLACKSHAW, A.W. Induction of oestrus and ovulation in prepubertal gilts for embryo collection. In: BATTERHAM, E.S. *Manipulating pig production III*. Australasian Pig Sci Assoc, 1991. p. 30.
- LUZ, S.L.N., NEVES, J.P., OLIVEIRA, J.F.C. Influência de várias preparações de PMSG na fecundidade de ovelhas corriedale inseminadas, via intrauterina, por laparoscopia, fora da estação reprodutiva. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 13, n. 1, p. 15-20, 1989.
- MORAES, J.C.F. Emprego do carneiro na indução e manipulação do ciclo estral em ovelhas durante o anestro. *A Hora Veterinária*, v. 11, n. 63, p. 32-34, 1991.
- PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 58, n. 2, p. 397-404, 1974.
- RAJAMAHENDRAN, R., RANIOWSKI, J., RAVINDRAN, V. Effects of PMSG and ram contact on the reproductive performance of progestagen-treated ewes during breeding and anestrous seasons. *Small Rumin Res*, v. 10, p. 341-347, 1992.
- SCARAMUZZI, R.J., DOWNING, J.A., CAMPBELL, B.K., et al. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. *Aust J Biol Sci*, v. 41, p. 37-45, 1988.
- SCHLEIF, R.F., WENSINK, P.C. *Practical Methods in Molecular Biology*. New York: Springer-Verlag, 1981. 220 p.
- WENTZ, I., SOBESTIANSKY, A.A.B., SCHEID, I.R. et al. Gonadotrofina sérica: I. Método de obtenção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1991, Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia: ABRAVES, 1991. p. 120.