

**SUPEROVULAÇÃO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM
CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus*)**

Superovulation with equine chorionic gonadotropin in Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*)

DJ Galindo H.^{*1}; JM Garcia²; MEF Oliveira²; JMB Duarte¹

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.36>

¹ Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Departamento de Zootecnia, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

* M.V., FCAV, UNESP, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

E-mail: dgalindoh89@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar protocolos de superovulação com eCG em cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Tratamento 1: inserção de CIDR®, aplicação i.m. de BE e GnRH (D-7). Aplicação i.m. de 800UI de eCG 5 dias após a inserção do CIDR® (D-2). Retirada do CIDR® e aplicação i.m. de Cloprostenol (D0). Aplicação i.m. de GnRH (indutor da ovulação) logo após a detecção do estro. Tratamento 2: diferente ao tratamento 1 no tempo da inserção do CIDR® (D-8) e a dose de eCG (D-3, 1200UI). Tratamento 3: diferente ao tratamento 2 no indutor da ovulação (LH i.m. entre 12-16 horas após estro). A contagem dos CLs e FOs foi realizada por laparotomia mediana ventral. Foram visualizados 2 CLs, 1 CL e 8 FOs, 10 CLs e 2 CAs, nos tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente. Todos os tratamentos foram efetivos na sincronização do estro. O tratamento 3 foi o mais efetivo para superovulação.

Palavras-chave: cervídeo, fisiologia da reprodução, conservação, eCG.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate eCG-based superovulation protocols in Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). Treatment 1: CIDR® insertion, EB and GnRH i.m. injection (D-7). An 800IU eCG i.m. injection 5 days

after CIDR® insertion (D-2). Withdrawal of the CIDR® and Sodic Cloprostenol i.m. injection (D0). A GnRH i.m. injection (ovulation inductor) soon after estrus detection. Treatment 2: different from treatment 1 at CIDR® insertion time (D-8) and eCG dose (D-3, 1200IU). Treatment 3: different from treatment 2 at

ovulation inductor (LH i.m. injection between 12-16 hours after estrus detection). CLs and OFs counting was performed by ventral midline laparotomy to evaluate the effectiveness of treatments. Counts were 2 CLs, 1 CL and 8OFs, 10 CLs and 2 ABs for treatments 1, 2 and 3, respectively. All treatments were effective in estrus synchronization, wherein treatment 3 was the most effective in superovulation terms.

Keywords: deer, reproductive physiology, conservation, eCG.

INTRODUÇÃO

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), também conhecido como suaçuetê, suaçupu, suaçuapara ou guaçupuçu, é a maior espécie de cervídeo da América Latina e um dos maiores mamíferos brasileiros (Duarte *et al.*, 2012). As fêmeas desta espécie caracterizam-se por não apresentar sazonalidade reprodutiva, são poliéstricas e geram um filhote por gestação. Duarte *et al.* (2012) mencionaram que não existem registros de partos gemelares nos animais mantidos em cativeiro. A duração média do ciclo estral é de $21,3 \pm 1,3$ dias, sendo o ciclo dividido numa fase inter-luteal de $6,4 \pm 1,2$ dias e uma fase luteal de $14,8 \pm 1,3$ dias (Polegato, 2008).

Algumas populações de cervo-do-pantanal se encontram em perigo crítico na maior parte do Brasil devido à construção de usinas hidrelétricas e à drenagem de zonas úmidas para fins agrícolas. Isto pode ocasionar a extinção desta espécie a longo prazo como efeito da endogamia, perda de variabilidade genética, diminuição do desempenho reprodutivo e perda de potencial evolutivo, causado pelo isolamento geográfico de pequenas populações.

Desde que a manutenção de populações cativas é uma importante ação para a conservação de espécies com alto risco de extinção na natureza, as técnicas reprodutivas podem auxiliar no manejo genético e na manutenção da variabilidade genética. Com isto, busca-se a obtenção de uma população com boa qualidade genética, que após reintrodução na natureza auxilie populações ameaçadas ou em perigo de extinção (Zúccari e Sereno, 2006).

Uma das técnicas para o controle da atividade hormonal que tem sido comumente utilizada é a superovulação (SOV), a qual tem como objetivo recrutar uma maior população de folículos ovarianos, bem como de ovulações, mediante a aplicação de hormônios exógenos, obtendo-se assim maior número de oócitos disponíveis para a fertilização e,

consequentemente, de embriões a cada ciclo estral (Zúccari e Sereno, 2006).

A variabilidade da resposta superovulatória é um fator limitante dentro dos protocolos de SOV. Apesar disso, a SOV já foi realizada com sucesso em diversas espécies de cervídeos, especialmente na espécie *Cervus elaphus*, com produção de 1,8 a 3,7 corpos lúteos (CL) em animais não selecionados e 5 a 11 CLs em selecionados para os programas de transferência de embriões (Asher *et al.*, 2000; Soler *et al.*, 2007). *Mazama gouazoubira* também respondeu aos protocolos de SOV com produção 0,8 a 6,0 CLs (Zanetti e Duarte, 2011).

Dentro dos protocolos de SOV em cervídeos, procura-se diminuir a manipulação dos animais devido ao estresse causado pelas sucessivas aplicações de hormônios, que poderiam comprometer ou alterar a resposta ao tratamento. Por este motivo, surge como uma opção a utilização de uma dose única de eCG (gonadotrofina coriônica equina) para produzir um superestímulo ovulatório sem precisar realizar aplicações contínuas de hormônio.

RELATO DO CASO

Animais

Foram utilizadas 3 fêmeas e 2 machos da espécie *B. dichotomus*. Os animais são originários de cativeiro (Programa de Conservação ex-situ do cervo-do-pantanal). Eles foram transferidos provisoriamente para as instalações do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal – São Paulo – Brasil.

Manejo

As fêmeas foram isoladas dos machos em baias individuais de 4,0 m x 4,0 m. Os animais foram acondicionados ao manejo por uma semana antes do experimento. A dieta e o manejo foram padronizados, o alimento foi oferecido nas baias às 9:00 e 17:00 horas. A dieta foi constituída por 1 kg de concentrado (ração equina – Equi Tech 12MA – Presence®), água ad libitum pela manhã e 2 kg de volumoso (soja, soja-perene ou ramos de amoreira) pela tarde. Pela manhã e tarde as fêmeas foram tiradas das baias e conduzidas pelo corredor principal até o piquete, enquanto era realizado o trato dos animais e a limpeza das baias. Posteriormente, os animais foram conduzidos às baias. O mesmo manejo foi realizado com os machos após o manejo das fêmeas. Os machos foram soltos no piquete pela manhã desde o último dia do tratamento (D0), para que pudessem marcar melhor seu território previamente à detecção do cio da fêmea.

Sincronização do estro e tratamento de SOV

Para o tratamento 1, em dia aleatório do ciclo estral (D-7), a fêmea foi sincronizada por meio da inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com 0,33g de progesterona, desenvolvido para ovinos e caprinos (CIDR® - Tipo T - Controlled Internal Drug Release® - Pfizer® - EUA) que foi mantido por 7 (sete) dias. Ainda no D-7, foi realizada uma aplicação i.m. de 0,5mg de benzoato de estradiol (BE) (Sincrodiol® - Ourofino Saúde Animal Ltda - Brasil) e 0,11mg de diacetato tetraidratado de gonadorelina (GnRH) (CYSTORELIN® - Merial® - USA) no momento da inserção do CIDR®. Para a indução do crescimento folicular foi realizada uma aplicação de 800UI de eCG (Folligon®, Intervet® do Brasil Veterinária Ltda) cinco dias após a inserção do CIDR® (D-2). No momento da retirada do CIDR® (D0) foi realizada uma aplicação de 530µg de cloprostenol sódico (Ciosin® - Shering Plough Coopers® - Brasil). A partir desse momento foram realizadas duas vezes ao dia a detecção do estro, agrupando a fêmea com um macho e observando sua resposta à tentativa de monta deste. O estro foi definido como o período em que a fêmea permitiu a cópula (Figura 1). Logo após a detecção do estro, foi realizada a aplicação de 0,11mg de GnRH. A inserção e retirada do CIDR® foi realizada por meio de contenção química com uma combinação de 0,5 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina e 1 mg/Kg de Azaperone, aplicada à distância por meio de dardos lançados por arma de pressão (Daninject). As demais aplicações hormonais foram realizadas com auxílio da caixa/brete.

Para o tratamento 2, foram realizadas duas modificações com relação ao tratamento 1. A primeira modificação foi no tempo da inserção do CIDR® (D-8) o qual foi mantido por 8 (oito) dias. A segunda modificação foi na dose e dia de aplicação de eCG, sendo aplicado no D-3 uma dose de 1200UI.

Para o tratamento 3, foi realizada uma modificação com relação ao tratamento 2. Esta modificação teve a ver com o indutor da ovulação. Sendo realizada uma aplicação i.m. de 2,5mg de hormônio luteinizante de pituitária suína (LH) (LUTROPIN®-V - Bioniche® - Canadá) entre 12 -16 horas após da detecção do estro.



Figura 1. Detecção de estro e cópula em cervos-do-pantanal

Avaliação da taxa de ovulação

A avaliação da taxa de ovulação foi realizada 8 dias após a primeira cópula (detecção do estro do animal). Para isso, as fêmeas foram submetidas a jejum sólido e hídrico de 24 horas e, posteriormente, anestesiadas com associação de 5,0 mg/Kg de cloridrato de quetamina (Vetaset® - Fort Dodge - Brasil) e 1 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum® - Bayer - Brasil) aplicada à distância por meio de um dardo lançado por arma de pressão (Daninject). Anestesia inalatória, pelo uso de isoflurano foi procedida durante o ato cirúrgico.

Foi realizada uma laparotomia mediana ventral para poder visualizar e expor os ovários, de modo que pudesse ser realizada a contagem dos CLs e das outras estruturas ováricas como são os folículos ovarianos (FOs) e corpos albicans (CAs). Ao final do procedimento, as incisões foram suturadas e as fêmeas receberam uma aplicação i.m. de 40.000 UI/Kg de penicilina benzatina e uma aplicação i.v. de 500 mg de fenilbutazona. As fêmeas receberam uma aplicação i.m. de 530µg de cloprostenol sódico para induzir a luteólise dos múltiplos corpos lúteos e prevenir a implantação de embriões que, eventualmente, permaneceram após a contagem.

RESULTADOS

As fêmeas expressaram estro em todos os tratamentos, permitindo a monta e cópula pelo macho (Figura 1). Também foi observado o reflexo de parada à pressão exercida no dorso ao momento do manejo (simulando a monta do macho) nas fêmeas dos tratamentos 1 e 3. No tratamento 1 foram visualizados 1 CL no ovário esquerdo (OE) e 1 CL no ovário direito (OD). No

tratamento 2 foram visualizados 3 FOs (cistos foliculares) no OE e 1 CL e 5 FOs (cistos foliculares) no OD. Por último, no tratamento 3 foram visualizados 7 CLs e 1 CA no OE (Gráfico 2) e 3 CLs e 1 CA no OD (Gráfico 3).

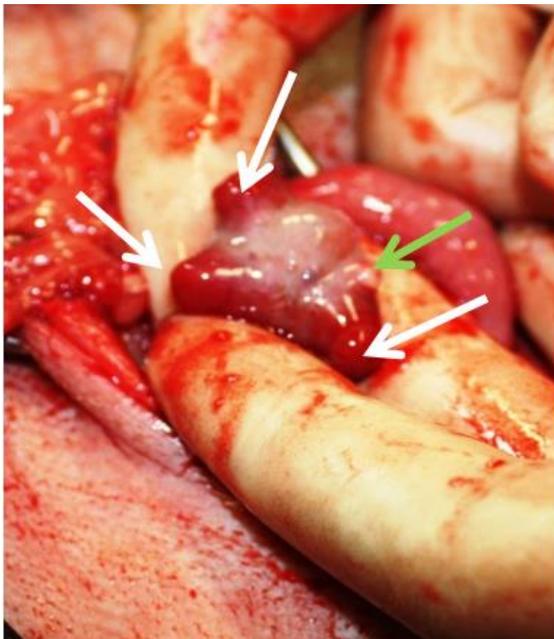
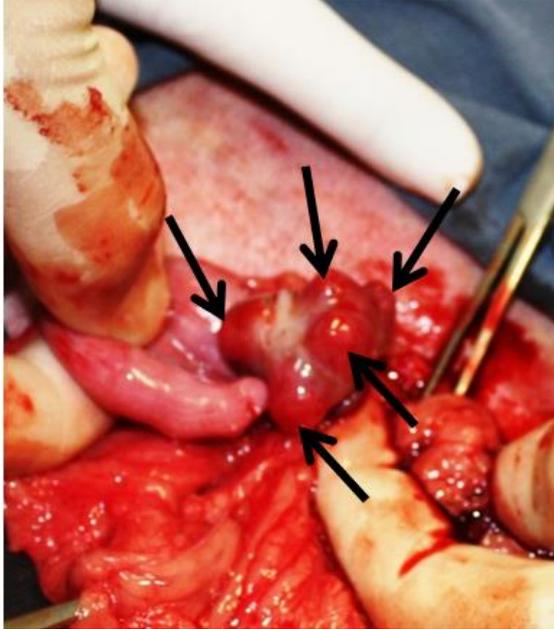


Figura 2 e 3. Ovario esquerdo (imagem acima) observando-se 5 dos 7 CLs (setas pretas). Ovario direito (imagem abaixo) com 3 CLs e 1 CA (setas brancas e verde respectivamente).

DISCUSSÃO

Tem sido reportada a utilização de eCG em protocolos de superovulação em espécies de cervídeos neotropicais como o *Mazama gouazoubira*, tendo sucesso ao momento de induzir um superestímulo de desenvolvimento folicular (Zanetti *et al.*, 2014). Este trabalho é o primeiro caso reportado de resposta superovulatória positiva ao eCG em *Blastocerus dichotomus*, sendo que as doses de eCG utilizadas nos 3 tratamentos efetuados nesta espécie foram maiores à descrita por Zanetti *et al.* (2014) em *Mazama gouazoubira* (700 UI de eCG). No entanto, o uso de doses altas de eCG tem sido associado com a ocorrência do desenvolvimento de folículos anovulatórios proporcional à dose usada (Gonzales-Reyna, 1999; Zanetti *et al.*, 2014). Assim também, há estudos que têm confirmado que doses de eCG entre 200 e 1000 UI, são requeridas pra promover uma única ovulação. Enquanto doses maiores, até 1500 UI e 2500 UI, são requeridas pra induzir superovulação em ovelhas e vacas, respectivamente (Oliveira, 2011; De Rensis e López-Gatius, 2014). Portanto, podemos vincular a superovulação com uma dose relativamente alta de eCG. Ao mesmo tempo, a utilização de dois protocolos de sincronização do estro como a combinação de Benzoato de Estradiol + Progesterona (para a indução de atrofia folicular) e a aplicação de GnRH (para a indução da ovulação) resultaram benéficos pela incerteza do estágio da onda folicular no início do tratamento. Adicionando que o fato de acrescentar mais um dia para a ação da progesterona e de eCG (tratamentos 2 e 3) pode ter tido um efeito positivo sobre a qualidade dos folículos em desenvolvimento e a resposta ao superestímulo de crescimento folicular.

A resposta ao reflexo de parada observada nos tratamentos 1 e 3 no momento do manejo das fêmeas, pode ser descrito como uma resposta individual e nem sempre vinculada à expressão do estro comportamental. Desde que entendamos que são animais de cativeiro e a possibilidade de realizar este tipo de detecção do estro vai estar ligado ao tempo e tipo de manejo que tenha sido realizado com estas fêmeas, como também ao caráter de cada indivíduo. Por esse motivo, a detecção do estro usando um macho foi escolhida neste trabalho, por ser uma forma mais eficaz e objetiva de detecção do estro da fêmea.

Por último, considerando que as fêmeas desta espécie são uníparas, a presença de dois CLs no tratamento 1 considerou-se como multiovulação. Enquanto o tratamento 2 falhou a indução da superovulação, resultando em múltiplos cistos foliculares. E o

tratamento 3 resultou em superovulação bem sucedida. Sendo que o LH demonstrou ser um melhor indutor da ovulação, em comparação com o GnRH (ante a falta de folículos anovulatórios). Isto pode ser explicado pela necessidade de um pico pré-ovulatório de LH na indução eficiente da ovulação dos folículos pré-ovulatórios.

CONCLUSÃO

Os tratamentos utilizado para induzir superovulação, baseados no uso de eCG tiveram boas respostas e podem ser preconizados para futuros estudos com SOV em cervos-do-pantanal, sendo que a dose de 1200UI de eCG foi a que gerou um melhor estímulo de crescimento folicular e uma boa resposta superovulatória em combinação com o LH como indutor da ovulação.

REFERÊNCIAS

- Asher GW, O'Neill KT, Scott BG, Mockett BG, Pearse AJ. Genetic influences on reproduction of female red deer (*Cervus elaphus*) (2) Seasonal and genetics effects on the superovulatory response of exogenous FSH. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 59(1-2): 61-70.
- De Rensis F, López-Gatiús F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a Review. *Reprod Dom Anim*, 2014; 49(2): 177-182.
- Duarte JMB, Piovezan U, Zanetti ES, Ramos HG da C. Espécies de cervídeos brasileiros com preocupações de conservação: Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Em: Duarte JMB, Reis ML, editores. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção. Brasília: Série Espécies Ameaçadas n° 22, ICMBio; 2012. p. 27-40.
- González-Reyna A, Márquez-García E, Lizárraga-Tracy H, Martínez-González JC. Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncromate-B implants. *Small Rum Res* 1999; 31(2):149-155.
- Oliveira MEF. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scientiae Veterinariae* 2011; 39(Suppl 1): 29-35.
- Polegato BF. Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em cativeiro. Dissertação (mestrado). Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2008. 74p.
- Soler JP, Mucci N, Kaiser GG, Aller J, Hunter JW, Dixon TE, Alberio RH. Multiple ovulation and embryo transfer with fresh, frozen and vitrified red deer (*Cervus elaphus*) embryos in Argentina. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 102(3-4): 322-327.
- Zanetti ES, Duarte JMB. Comparison of three protocols for superovulation of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Zoo Biology* 2012; 31(6): 642-655.
- Zanetti ES, Munerato MS, Cursino MS, Duarte JMB. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12:24.
- Zuccari CSN, Sereno JRB. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à conservação de cervídeos. 1º Edição, Planaltina: Embrapa Cerrados; 2006.
- Romo S. Biotecnología reproductiva: avances en ganado bovino. *Boletín Técnico Internacional. Schering-Plough División Veterinaria*, 1994; 1-8.
- Rorie RW, Godke RA. Bisection of bovine embryos. In: *Embryotechnologies to domestic animals* T. Greve, editor. Codenhagen. 1987; 1-9.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod.* 2003; 68:571-8.
- Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 1984; 114: 240-243.
- Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GE. Bisecting bovine embryos: methods, applications and success rates. *Proceedings of the Animal Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle.* Denver, CO, USA, 1983, pp. 45-51.
- Williams, TJ, Elsdon, RP, Seidel, GE. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 1984; 22: 521-531.