

INTERPRETAÇÃO DE PERFIS DE PROGESTERONA DURANTE A SINCRONIZAÇÃO DOS CICLOS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES FIV EM VACAS ALENTEJANAS.

UNDERSTANDING PROGESTERONE PROFILES DURING OESTRUS CYCLE SYNCHRONISATION PRIOR TO *IN VITRO* EMBRYO TRANSFER IN ALENTEJANO BEEF COWS.

A. E. M. Horta, M. Irene Vasques and Carla C. Marques

Dpto. de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional-INIA, Vale de Santarém

Resumo

No âmbito do projecto ECLAIR nº AGRE 0018 realizado entre 1990 e 1993 e co-financiado pela CEE, 486 vacas de raça Alentejana receberam um tratamento para sincronização do ciclo éstrico e posterior inseminação artificial e/ou transferência de embriões FIV (TE). O tratamento de sincronização consistiu na implantação auricular de um progestagéneo (Norgestomet) durante 9 dias, injeção por via intravulvo-submucosa (i.v.s.m.) de um agente luteolítico (PGF₂ α , 10 mg/dose) ao 7º dia e administração i.m. de 500 UI de gonadotrofina sérica equina (PMSG) no dia da remoção do implante. No dia da implantação progestagénica todas as vacas receberam uma injeção i.m. contendo valerato de estradiol (5mg) e norgestomet (3mg). Em 471 vacas tratadas recolheram-se amostras de sangue no dia da implantação progestagénica, ao 7º e ao 9º dia pós-implantação. De 86 vacas com cio detectado e que foram implantadas com embriões FIV 7-8 dias depois, colheram-se amostras de sangue na altura da TE. As amostras de sangue serviram para o doseamento da progesterona plasmática (P₄) através de um método radioimunológico de fase sólida.

No momento da sincronização, detectaram-se 18,7% de vacas em aciclia e 81,3% de vacas cíclicas tendo mostrado sinais de cio 76,1% e 66,1% respectivamente (65,8% do total de vacas sincronizadas). As vacas em diestro no dia 7 (n=225) representaram 58,8% do total de vacas cíclicas. A PGF₂ α não induziu a regressão do corpo lúteo (CL) em 48 horas, em 42 de 225 casos (18,7%), representando 11% relativamente ao total de vacas cíclicas. A PGF₂ α induziu a luteólise com êxito nos restantes 183 de 225 casos (81,3%), representando 47,8% em relação às vacas cíclicas. No grupo de vacas cíclicas houve 145 vacas cujo CL regrediu até ao dia 7 (37,9%) quer espontaneamente, quer por acção do estrogénio administrado no 1º dia do tratamento. Estas vacas apresentaram uma expressão de cios de 75,2%. Foram detectados 8 casos caracterizados pela presença de CLs jovens ao 7º dia, representando 2,1% relativamente às vacas cíclicas. Nestes animais a PGF₂ α não conseguiu provocar a regressão do CL. Em 5 de 383 vacas cíclicas (1,3%) parece ter ocorrido uma ovulação ou uma luteinização folicular durante o período de tratamento progestagénico. Apesar de níveis de P₄ elevados em 50 vacas no dia da remoção dos implantes, 23 manifestaram sinais de cio (46%), sugerindo que o processo luteolítico estava em curso nestes animais no dia 9 por acção da PGF₂ α (a ineficácia luteolítica real da PGF₂ α nos animais em diestro foi assim de 9,8%). Estas vacas apresentaram, nesta altura, níveis de P₄ significativamente inferiores aos das que não manifestaram cio (0,59 \pm 0,29 vs. 1,47 \pm 1,35 ng/ml, respectivamente; P=0,003). Ciclos curtos foram detectados em 3 de 5 vacas, as quais evidenciaram cio pouco tempo depois de uma presumível ovulação/luteinização folicular ocorrida durante o tratamento progestagénico. Os cios distribuíram-se durante 96 horas após a remoção dos implantes, havendo

85% de vacas em cio até às 48 horas. No dia da TE, as concentrações de P₄ foram inferiores a 0,5 ng/ml em 10 de 86 vacas (11,6%), apesar de todas apresentarem um corpo lúteo palpável, sugerindo a ocorrência de ovulações anormais que conduzem a uma função lútea sub-normal e a uma correspondente quebra na taxa de concepção.

Summary

A total of 486 cows were treated for oestrous cycle synchronization to be used as recipients for IVF embryo transfers (ET) under the research contract n° AGRE 0018 of the EC ECLAIR program. The synchronisation treatment consisted of a progestogen ear implantation (Norgestomet, Crestar®, Intervet) for 9 days plus an intra-vulvo-submucous (ivsm) injection of PGF₂α (Dynolitic®, UpJohn, 10 mg/dose) on day 7 and PMSG (500 I.U., i.m.) on day 9. All cows received i.m. 5 mg of oestradiol valerate on the day of Norgestomet implantation. Blood samples for progesterone (P₄) determinations were collected at the day of progestogen implantation, on day 7 and on day 9. From 86 cows implanted with IVF embryos, blood samples were also collected at the day of ET (day 7 after oestrus). The method used to measure plasma P₄ (RIA) does not cross-react with Norgestomet.

At the start of synchronisation treatment 18.7% of the cows were acyclic and 81.3% were cycling, oestrus being induced in 76.1% and 66.1% of the animals respectively, accounting for a total of 65.8% of cows showing oestrus. Cows in dioestrus at day 7 (n=225) accounted for 58.8% of cyclic animals. PGF₂α did not succeed in provoking luteolysis in 48 hours in 42 out of 225 cows presenting luteal function (18.7%), representing 11% relatively to all cyclic animals. In the remaining 183 out of 225 cows (81.3%), PGF₂α was effective in provoking luteolysis (47.8% relatively to all cyclic cows). Corpora lutea (CL) was detected to regress either spontaneously or by the action of the oestradiol valerate, between the first day of treatments and day 7, in 145 out of all cyclic cows (37.9%). These animals presented a heat response of 75.2%. At day 7, 8 cases of young refractory CL to PGF₂α were detected, accounting for 2.1% of the cyclic cows. An ovulation or follicle luteinization is suggested to have occurred during the progestogen treatment in 5 out of 383 cyclic cows (1.3%). In spite of having high P₄ levels at the day of implant removal, 23 out of 50 cows (46%) were detected in standing heat afterwards, suggesting that the luteolytic process was taking place by day 9 of treatment in these animals, traducing a final inefficiency of PGF₂α in provoking luteolysis on dioestrous cows of 9.8% (22/225). The P₄ levels at day 9 in these cows were significantly lower than those of cows not showing standing heat (0.59 ± 0.29 vs 1.47 ± 1.35 ng/ml, respectively; $P=0.003$). Short oestrous cycles were detected in 3 out of 5 cows presenting a standing heat after an ovulation/follicle luteinization being detected during treatment. Cows responding to treatment presented a standing heat during the next 96 hours after implant removal, 85% showing oestrus during the first 48 hours. Progesterone concentrations at the time of embryo transfer were below 0.5 ng/ml in 10 out of 86 cows (11.6%), in spite of a CL has been detected by rectal palpation, suggesting that abnormal ovulations conducting to a sub-normal luteal function occurred in these animals leading to a correspondent drop in conception rate.

INTRODUÇÃO

Neste trabalho procurou-se, através da monitorização das concentrações de progesterona, interpretar o efeito do tratamento curto (9 dias) com progestagêneos associados à PGF₂ α e PMSG na sincronização do ciclo éstrico em vacas Alentejanas que serviram para receptoras de embriões FIV. A transferência de embriões, contrariamente à inseminação artificial que pode ser efectuada em fêmeas não manifestando cio, exige, pelo seu custo, que as fêmeas tenham exibido cio oferecendo assim maiores garantias quanto ao sucesso da operação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 486 vacas adultas da raça Alentejana exploradas em regime extensivo para sincronização do ciclo éstrico e posterior inseminação artificial (IA) e/ou transferência de embriões (TE) produzidos totalmente *in vitro* (FIV). O tratamento de sincronização consistiu na implantação auricular de um progestagêneo (Norgestomet; Crestar®) durante 9 dias, injeção em dose reduzida por via intravulvo-submucosa (i.v.s.m.) de um agente luteolítico (PGF₂ α , 10 mg) (1, 2) ao 7º dia e administração i.m. de 500 UI de gonadotrofina sérica equina (PMSG, Chronogest®) no dia da remoção do implante. No dia da implantação progestagénica todas as vacas receberam uma injeção i.m. contendo valerato de estradiol (5mg) e norgestomet (3mg). Os cios foram detectados durante 4 dias após a remoção do implante em duas sessões diárias de 3 horas.

Em 471 vacas tratadas recolheram-se amostras de sangue no dia da implantação progestagénica, ao 7º e ao 9º dia pós-implantação para doseamento de progesterona (P4) por radioimunoensaio em fase sólida segundo método descrito anteriormente (3). Em 86 vacas sincronizadas, nas quais se detectou o cio, colheram-se igualmente amostras para doseamento da P4 no momento da TE que foi realizada 6-8 dias após o cio. Os embriões FIV utilizados (frescos ou descongelados) foram produzidos por fertilização *in vitro* de oócitos colhidos de vacas abatidas em matadouro (4).

No momento da TE todas as vacas foram palpadadas por via transrectal para a detecção de corpos lúteos presentes nos ovários.

Níveis de P4 iguais ou superiores a 0,5 ng/ml foram considerados como critério para identificação de função lútea. O antisoro utilizado para o doseamento da P4 não apresentou reacções cruzadas com o progestagénio utilizado nos tratamentos.

RESULTADOS

Das 486 vacas sincronizadas, 320 (65,8%) foram detectadas em cio. Das 471 vacas controladas com doseamento de P4, detectaram-se 18,7% de vacas em aciclia e 81,3% de vacas cíclicas tendo mostrado sinais de cio 76,1% e 66,1% respectivamente (65,8% do total de vacas sincronizadas, Tabela 1). Os resultados apresentados seguidamente identificam a existência de valores de P4 acima ou iguais ao limiar de 0,5 ng/ml com a presença de um corpo lúteo (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das vacas implantadas com Norgestomet de acordo com a função lútea ovárica determinada pelo doseamento da P₄ e correspondente expressão éstrica.

	Incidência		Padrão de P ₄ ↑↓ 0,5 ng/ml			Cio	
	n	%	D0	D7	D9	n	%
Total (doseadas)	471	100				320	67,9
Acíclicas	88	18,7	↓	↓	↓	67/88	76,1
Cíclicas:	383	78,8	↑ ou	↑ ou	↑	253	66,1
CL refractário	8	2,1	↓	↑	↑	3	37,5
Falha da PGF em 48h	42	11,0	↑	↑	↑	20	47,6
Falha da PGF (total)	(22	5,7)					
Luteolise induzida	183	47,8	↑↓	↑	↓	118	64,5
Luteolise natural	145	37,9	↑	↓	↓	109	75,2
Ovul. durante o trat.	5	1,31	↑↓	↓	↑	3	75,0

As vacas em diestro no dia 7 (n=225) representaram 58,8% do total de vacas cíclicas. Aparentemente, a PGF_{2α} não conseguiu provocar a regressão do CL em 48 horas em 42 de 225 vacas (18,7%) que no dia 7 se encontravam em diestro, representando 11% relativamente ao total de vacas cíclicas. Mas dado que destas 42 vacas, 20 fizeram cio no prazo esperado, pode-se considerar que somente em 22 fêmeas (9,8% relativamente às fêmeas em diestro em D7) a PGF_{2α} não conseguiu provocar a regressão do CL. A luteolise por efeito da PGF_{2α} foi conseguida com êxito nos restantes 183 de 225 casos (81,3%), representando 47,8% em relação às vacas cíclicas, havendo uma incidência de 64,5% de cios neste grupo.

No grupo de vacas cíclicas houve 145 vacas (37,9%) cujo CL regrediu até ao dia 7 (função lútea detectada no dia da implantação) quer espontaneamente, quer por acção do estrogénio administrado no 1º dia do tratamento. Neste grupo de animais a incidência de cios foi de 75,2%.

Foram detectados 8 casos caracterizados pela presença de CLs jovens ao 7º dia, representando 2,1% relativamente às vacas cíclicas. Neste grupo de animais a PGF_{2α} não conseguiu provocar a regressão do CL de metaestro em 5, visto que 3 manifestaram cio. Em 5 de 383 vacas cíclicas (1,3%) parece ter ocorrido uma ovulação ou uma luteinização folicular durante o período de tratamento progestagénico.

Apesar de terem sido detectados níveis de P₄ elevados no dia da remoção dos implantes em 50 vacas (13,1% em relação às vacas cíclicas), 23 manifestaram sinais de cio (46%) num prazo após a remoção dos implantes considerado normal, sugerindo que o processo luteolítico estava em curso nestes animais no dia 9. Estas vacas apresentaram, nesta altura, níveis de P₄ significativamente inferiores aos das que não manifestaram cio ($0,59 \pm 0,29$ vs. $1,47 \pm 1,35$ ng/ml respectivamente; P=0,003, Tabela 2). Destes 23 animais, 20 pertenceram ao grupo de animais em que se considerou haver uma falha da PGF_{2α} em provocar a luteolise 48 horas após a sua administração.

Ciclos curtos foram detectados em 3 de 5 vacas, as quais evidenciaram cio pouco tempo depois de uma presumível ovulação/luteinização folicular ocorrida durante o tratamento progestagénico. Os cios em 320 vacas distribuíram-se durante 96 horas após a remoção dos implantes, havendo 85% de vacas em cio até às 48 horas (Figura 1).

Tabela 2 - Vacas com P₄ elevada em D9: diferenças entre animais que manifestaram ou não comportamento éstrico.

Animais	(n)	P ₄ em D9 (ng/ml)	ANOVA-LSD P ≤ 0,003
		X ± dp	
Com manifestação de cio	23	0,59 ± 0,29	a
Sem manifestação de cio	27	1,47 ± 1,35	b

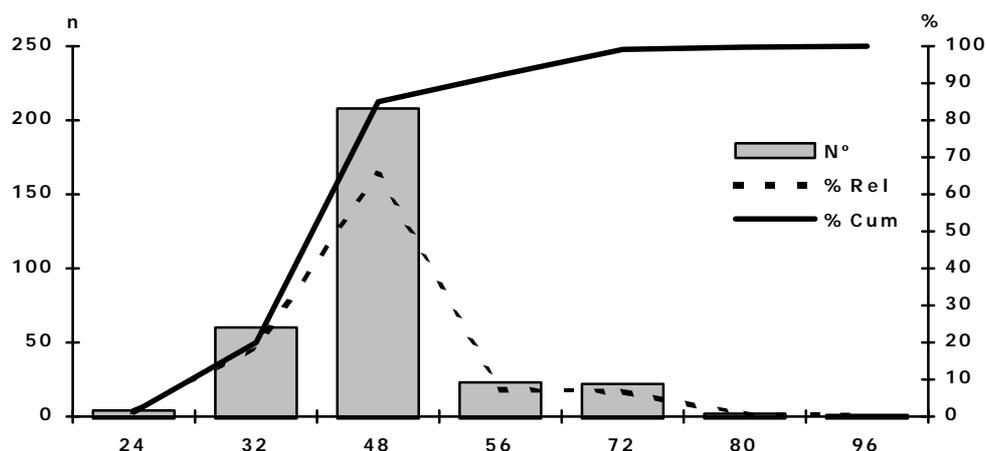


Figura 1 - Distribuição numérica, relativa e cumulativa dos cios, após a remoção dos implantes (horas).

Sete dias após o cio (dia da TE), as concentrações de P₄ foram inferiores a 0,5 ng/ml em 10 de 86 vacas (11,6%), apesar de todas apresentarem um corpo lúteo palpável, sugerindo a ocorrência de ovulações anormais que conduzem a uma função lútea sub-normal e a uma correspondente quebra na taxa de concepção.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Num trabalho anterior (5) em que se realizou a sincronização do cio no mesmo efectivo com duas aplicações de PGF_{2α} intervaladas 11 dias, verificou-se que somente 30% das fêmeas tratadas (dum total de 160 vacas) manifestaram comportamento éstrico. Resultados semelhantes (35%) foram obtidos por Lopes da Costa et al. (6) na raça Mertolenga. Se admitirmos que 78,8% destas fêmeas se encontravam cíclicas, como transparece dos resultados no presente trabalho, teremos que concluir que este método (2 x PGF_{2α}) só consegue provocar o cio em 38,1% das fêmeas cíclicas contra 66% de eficácia do tratamento associando Norgestomet, PGF_{2α} e PMSG no mesmo tipo de fêmeas. Acresce ainda que o tratamento progestagénico, que está de acordo com trabalhos anteriores (7), consegue induzir o cio em 76% das fêmeas acíclicas, efeito este que é nulo quando se utiliza somente a PGF_{2α}. Se compararmos a eficácia deste último método com o obtido em vacas leiteiras em pastoreio, utilizando doses e vias de administração standard (8) ou iguais às utilizadas neste trabalho (2), teremos que concluir que a vaca Alentejana apresenta uma

menor capacidade para exprimir o cio após luteólise induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$. Com efeito, neste trabalho verificou-se que somente em 9,8% das vacas tratadas em diestro com $\text{PGF}_{2\alpha}$ não houve luteólise completa, confirmando para esta raça resultados anteriores demonstrando que a diminuição da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para menos de metade da indicada pelo fabricante, quando administrada por via i.v.s.m., não afecta as propriedades luteolíticas da droga (**1, 2, 9, 10, 11, 12, 13**).

Na classe de vacas cíclicas em que se verificou a luteólise até ao 7º dia de tratamento (37,9% das vacas cíclicas), houve uma incidência de cios de 75,2%, valor que mais se aproximou do das vacas acíclicas (76,1%). A classe que se seguiu foi aquela em que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziu a regressão de um corpo lúteo com 64,5% dos animais exibindo cio.

Neste trabalho o tratamento de sincronização dos cios foi eficaz em 65,8% das vacas tratadas (dispersos entre as 24 e 96 horas) e pode considerar-se idêntico ou superior ao obtido por outros autores em raças de carne com tratamentos semelhantes. Embora o pico de animais em cio, neste trabalho, aconteça na mesma altura (48 h após o tratamento) que no trabalho de Smith et al., (**14**), a percentagem observada por estes autores é inferior (36% vs 85%).

O disfuncionamento luteínico observado ao 7º dia após o cio (11,6% de vacas com $\text{P4} < 0,5$ ng/ml) está de acordo com outros autores que observaram percentagens semelhantes ou superiores após sincronização com progestagénios: 14,7% (**15**) e 40% (**6**). Níveis baixos de P4 no dia da ET podem ser devidos a uma actividade sub-normal do CL ou a estros anovulatórios. Niemann et al. (**16**) encontraram 25% de novilhas com níveis de P4 baixos nesta altura, embora apresentassem um corpo lúteo palpável como no presente trabalho. Os animais nestas condições não conseguem ficar gestantes.

Estes resultados, não só pela amostragem utilizada, como pelo facto das experiências terem decorrido durante três anos e terem sido realizados em duas estações de reprodução bem demarcadas para esta raça (Outono/Inverno e Primavera), podem ser tidos como representativos. Com efeito, os resultados obtidos permitem-nos tirar conclusões sobre o grau de eficácia do tratamento progestagénico no bloqueio à ovulação, do efeito do tratamento progestagénico associado à PMSG na estimulação da ciclicidade ovárica de animais em anestro, do efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na sincronização de fêmeas em diestro, que de outro modo não conseguiriam manifestar cio sincronizado neste tipo de tratamento progestagénico de curta duração.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Horta, A.E.M., Costa, C.M.S.G., Robalo Silva, J. e Vasques, M.I. (1984). A injeção por via intravulvomucosa permite reduzir as doses das prostaglandinas utilizadas na luteólise e sincronização dos ciclos éstricos em bovinos. II Simpósio Internacional de Reprodução Animal, SPRA, 21-24 Nov. Lisboa, pp. 230-232.
- 2 - Horta, A.E.M., Costa, C.M.S.G., Robalo Silva, J. e Vasques, M.I. (1986). Possibility of reducing the luteolytic dose of cloprostenol in cyclic dairy cows. *Theriogenology*, **25**:291-301.
- 3 - Vasques, M.I. (1990). Relatório de actividades. Adenda. EZN/INIA, Vale de Santarém.
- 4 - Gordon, I. e Lu, K.H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, **33**:77-87.

- 5 - Horta, A.E.M., Marques, C.M., Vasques, M.I., Leitão, R.M. (1991). Sincronização do ciclo éstrico em fêmeas bovinas Alentejanas aplicada à transferência de embriões Ciclo de Palestras da EZN, Vale de Santarém.
- 6 - Lopes da Costa, L.F., Freitas Duarte, A.J., Nunes Duarte, J.C., Cidadão, M.R., Chagas e Silva, J.N. (1992). Estrus induction in Mertolengo heifers and fertility after transfer of frozen-thawed holstein embryos. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, AERA, Salamanca, Libro de Comunicaciones, pp 203-208.
- 7 - Thimonier, J., Chupin, D., Mauleon, P., Ortavant, R. (1974). Influence d'un analogue des prostaglandines (ICI 80996) et d'un progestagène (SC 21009) sur la durée de vie du corps jaune et l'apparition de l'oestrus chez les bovins. *C.R. Acad. Sc.*, Paris, **279**:1285-1288.
- 8 - Horta, A.E.M., Costa, C.M.S.G. (1982). Sincronização do ciclo reprodutivo num rebanho de vacas Holando-Portuguesas com PGF₂ α . *Rev Port. Ciênc. Veter.*, **77**:215-230.
- 9 - Ono H., Fukui, Y., Terawaki, Y., Ohboshi, K., Yamazaki, D. (1982). An intravulvosubmucous injection of prostaglandin F₂ α in anoestrous cows. *Anim. Reprod. Sci.*, **5**:1-5.
- 10 - Holý, L. (1984). Submucous vestibulo-vaginal implantation of cloprostenol (Oestrophan Spofa) to cows, as related to oestral activity, conception and progesterone levels in milk. *Veter. Med. (Praha)*, **29**:513-519.
- 11 - Chauhan, F.S., Mgongo, F.O.K., Kessy, B.M., Gombe, S. (1986). Effects of intravulvosubmucosal cloprostenol injections on hormonal profiles and fertility in subestrous cattle. *Theriogenology*, **26**:69-75.
- 12 - Alberio, R.H., Butler, H.N., Schiersmann, G.C.S., Tortonese, D., Torquati, O. (1987). Induction of luteolysis by means of reduced dose of a luteolytic agent. *Anim. Breed. Abstr.*, **55**:760 (abst.).
- 13 - Alvarez, R.H., Meirelles, C.F., Ambrosano, G.M.B., Oliveira, J.V., Pozzi, J.R. (1991). The use of lower doses of prostaglandin analogue, Cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, **25**:93-96.
- 14 - Smith, R.D., Pomerantz, A.J., Beal, W.E., McCann, J.P., Pilbeam, T.E., Hansel, W. (1984). Insemination of Holstein heifers at a preset time after estrous cycle synchronization using progesterone and prostaglandin. *J. Anim. Sci.*, **58**: 792-800
- 15 - King, M.E., Lefever, D.G., Brown, L.N., Neubauer, C.J. (1986). Synchronization of estrus in embryo transfer recipients receiving demi-embryos with Syncro-Mate B. *Theriogenology*, **26**:221-229.
- 16 - Niemann, H., Sacher, B., Elsaesser, F. (1985). Pregnancy rates related to recipient plasma progesterone levels on the day of non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, **23**:631-639.