

REVERSÃO DA VACINA ANTI-GnRH COM ADMINISTRAÇÃO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM FÊMEAS BOVINAS

JÉSSICA LAZZARI¹, RICARDO DELLA MÉA², MONIQUE TOMAZELE ROVANI³, PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES⁴, BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – jelazzari@hotmail.com

²Universidade Federal de Santa Maria - ricardodellamea10@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul - mtrovani@gmail.com

⁴Universidade federal da Pampa – paulogoncalves@unipampa.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões é uma biotecnologia que possibilita a multiplicação de fêmeas de alto mérito genético, na qual, obtém-se maior número de descendentes de um mesmo acasalamento. Em 2019, a produção mundial foi em torno de 1,4 milhões de embriões transferíveis, destes 72,7% oriundos da produção *in vitro* (PIV), enquanto o restante (27,3%) da produção *in vivo*. Do total de embriões PIV, aproximadamente 98% dos embriões produzidos foram obtidos a partir da aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* – OPU), o que demonstra a importância e o impacto da técnica (CHAIR, 2020).

A intensa utilização de vacas e novilhas como doadoras de óócitos e a ausência de gestação por períodos prolongados leva a desequilíbrios endócrinos, que juntamente ao sobrepeso predispõem a ocorrência da doença cística ovariana crônica (COD) (VIANA et al., 2021). A enfermidade causa progressiva supressão do crescimento folicular, além de que animais podem se tornar refratários ao tratamento convencional. Dessa forma, essas fêmeas, de alto mérito genético e valor agregado, mas improdutivas, são descartadas. Assim, faz-se necessário a utilização de tratamentos alternativos, que evitem o descarte e prolonguem a vida produtiva desses animais.

O tratamento com vacinas anti-GnRH reduz a frequência e amplitude dos pulsos do hormônio luteinizante (LH) e limita a níveis basais a concentração do hormônio folículo estimulante (FSH) (FINNERTY et al., 1998). Viana et al. (2021) imunizaram com a vacina anti-GnRH vacas Nelore com COD e observaram a regressão cística de 12 dos 14 animais incluídos no estudo. Além disso, ao submeterem os animais a OPU, na 10^a a 12^a semanas após a primeira dose do imunizante, observaram que a competência oocitária de desenvolvimento *in vitro* não foi prejudicada e a taxa de clivagem foi semelhante àquela obtida com óócitos de ovários de abatedouro.

Balet et al. (2014) ao avaliarem a imunização com anti-GnRH em vacas Holandês saudáveis, observaram que entre a 12^a e 17^a semana após a primeira aplicação, o título de anticorpos se encontrava em nível basal, em aproximadamente 63% dos animais. Além disso, os autores obtiveram taxa de prenhez positiva em 10 das 11 vacas, após a sincronização, passadas 30 semanas da primeira aplicação.

Dessa forma, os estudos indicam que a aplicação do imunizante anti-GnRH é eficaz no controle de COD e não afeta o desempenho reprodutivo nas fases seguintes. Contudo, o intervalo entre a primeira aplicação e o retorno ao ciclo reprodutivo é um gargalo a ser estudado. Em vista disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a reversão da imunocastração com vacina anti-GnRH através da suplementação com gonadotrofina exógena.

2. METODOLOGIA

Seis vacas cíclicas, das raças Holandês e Jersey, não lactantes, receberam duas doses da vacina anti-GnRH (Bopriva, Zoetis, Brasil), no intervalo de 30 dias. Após 15 dias da segunda aplicação, as vacas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica, na qual, observou-se apenas folículos com diâmetro ≤ 4 mm. Neste mesmo dia, correspondente ao D0, as vacas receberam 830 UI de eCG (Gonadotrofina Coriônica equina, Novormon – Zoetis) e um implante de 1g de P4 (progesterona – DIV - Zoetis). Passadas 48 h (D2), receberam outra dose de 830 UI de eCG. Acompanhou-se a dinâmica folicular a cada 24 ou 48 h para avaliação do crescimento folicular. No D6,5 do experimento, retirou-se o DIV e nas vacas com folículos pré-ovulatórios (> 11 mm), foi induzida a ovulação com aplicação de 1250 UI de hCG (Gonadotrofina Coriônica humana, Chorulon – MSD Saúde Animal). Por meio da ultrassonografia, no D9, foi avaliada a ovulação e em D11 e D14, a integridade dos corpos lúteos. Amostras de sangue foram coletadas em tubos de 4 mL em D6,5, D9, D11 e D14, para mensuração das concentrações de P4 circulantes, através de quimiluminescência.

O diâmetro folicular e a concentração de P4 foram avaliados ao longo do tempo por modelos mistos para dados repetidos. O efeito do dia foi incluído como efeito fixo no modelo e a vaca como a unidade experimental. Diferentes estruturas de covariância foram avaliadas e utilizado "Compound Symmetry Unequal Variances" e "Unequal Variances", respectivamente para diâmetro folicular e concentração de progesterona, porque os modelos apresentaram menor Critério de Informação de Akaike (AIC). A diferença entre os dias foi determinada pelo teste de Tukey HSD. A distribuição normal dos resíduos foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk W. As análises foram realizadas utilizando o software JMP, sendo adotado um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em duas semanas após a segunda dose do imunizante anti-GnRH, cinco das seis vacas (83,3%) responderam ao tratamento, pois não apresentavam folículos grau III (>9 mm e <2 cm), apenas folículos menores que 4 mm; com exceção de uma que tinha uma estrutura cística que permaneceu estática ao longo do período. A ausência de folículos grau III é considerada como o melhor indicador clínico de anestro e da efetividade da vacina anti-GnRH (BALET et al., 2014).

O FSH contribui no crescimento de folículos a partir de 4mm de diâmetro (GONG et al., 1996). Por isso, mesmo na ausência de gonadotrofinas endógenas, observa-se pequenos folículos em ovários de vacas imunocastradas. Em vista disso, suplementou-se com eCG, cuja função é semelhante ao FSH e LH (MURPHY e MARTINUK, 1991), a fim de induzir a continuidade do crescimento folicular.

Após a segunda aplicação de eCG, quatro vacas responderam ao tratamento, onde no D6,5, apresentaram no mínimo um folículo > 11 mm (Fig. 1). Na avaliação no D9, as quatro vacas responderam a aplicação de hCG e ovularam. Por isso, mensurou-se os níveis de P4 com o intuito de avaliar a capacidade de produção hormonal dos corpos lúteos e inferir se as concentrações eram similares às observadas em vacas cíclicas superovuladas. Em nosso estudo, as concentrações de P4 no D6,5 ($2,9 \pm 0,3$ ng/mL) foram resultantes dos implantes vaginais utilizados. No D9 foram observadas concentrações basais ($1 \pm 0,1$ ng/mL), o que era esperado, uma vez que as vacas estavam no período periovulatório. Após as ovulações, as concentrações médias de P4 ($10,32 \pm 3,40$ ng/mL no D11 e $42,70 \pm 7,74$ ng/mL no



D14), foram similares às observadas em vacas superovuladas após a ovulação de múltiplos folículos.

A PIV possibilita a aspiração de folículos em fases aleatórias do ciclo estral. Todavia, a divergência folicular e o estabelecimento do folículo dominante impedem o desenvolvimento de folículos subordinados, induzindo-os a atresia (GINTHER et al., 2003). A utilização de protocolos de sincronização do estro permite que a OPU ocorra em momentos de melhor competência oocitária e reduz a aspiração de folículos atrésicos (CAVALIERI et al., 2018). Ademais, Sarwar et al. (2020) observaram que folículos $\geq 6\text{mm}$, mesmo diâmetro encontrado em D4 no presente estudo, apresentaram melhor capacidade de desenvolvimento *in vitro*.

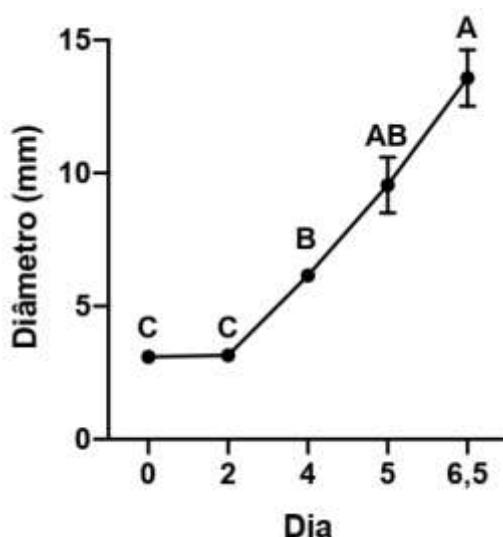


Figura 1: Crescimento folicular de vacas imunizadas com vacina anti-GnRH. Em D0, os animais receberam eCG e um dispositivo de P4. Passados dois dias (D2), foi administrada a segunda dose de eCG. No D6,5 induziu-se a ovulação com hCG.

Três das quatro vacas que responderam ao tratamento e ovularam múltiplos folículos. Viana et al. (2021) concluíram que a contagem de folículos antrais (CFA) de vacas com COD imunizadas foi semelhante ao grupo cíclico, em 24 e 96h após a OPU. A CFA é considerada um preditor da fertilidade e está correlacionado positivamente com o número de complexos-cúmulos-oócito recuperados (BONI et al., 1997). Desse modo, como o protocolo de reversão da vacina anti-GnRH, proposto no presente estudo, controla a emergência da onda folicular, também proporciona a identificação do momento mais adequado para a aspiração de oócitos em quantidade e, possivelmente, de maior qualidade.

4. CONCLUSÕES

A utilização da eCG foi eficiente na retomada da atividade ovariana de vacas imunocastradas. O crescimento folicular e concentração de progesterona indicam que os folículos são viáveis e podem ser utilizados na PIV. Para melhor definir esta competência, é necessária a realização de novos estudos que avaliem o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* dos oócitos aspirados de vacas imunocastradas tratadas com eCG.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALET, L.; JANETT, F.; HÜSLER, J.; PIECHOTTA, M.; HOWARD, R.; AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; STEINER, A.; HIRSBRUNNER, G. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in dairy cattle: Antibody titers, ovarian function, hormonal levels, and reversibility. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2193-2203, 2014.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 277-289, 1997.
- CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; COLOMBO, A. H. B.; ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P.; RIGOLON, L. P. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 117, p. 57-60, 2018.
- CHAIR, J. V. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: **Embryo Technology Newsletter**, v. 38, n. 4, 2020.
- FINNERTY, M.; ENRIGHT, W. J.; ROCHE, J. F. Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. **Reproduction**, v. 114, n. 1, p. 85-94, 1998.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.
- GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 68-74, 1996.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.
- SARWAR, Z.; SAAD, M.; SALEEM, M.; HUSNAIN, A.; RIAZ, A.; AHMAD, N. Effect of follicle size on oocytes recovery rate, quality, and in-vitro developmental competence in Bos indicus cows. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, 2020.
- VIANA, J. H. M.; PEREIRA, N. E. S.; FARIA, O. A. C.; DIAS, L. R. O.; OLIVEIRA, E. R.; FERNANDES, C. A. C.; SIQUEIRA, L. G. B. Active immunization against GnRH as an alternative therapeutic approach for the management of Bos indicus oocyte donors diagnosed with chronic cystic ovarian disease. **Theriogenology**, v. 172, p. 133-141, 2021.