

EFICIÊNCIA DO ACETATO DE DESLORELINA E DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM ÉGUAS

Cely Marini Melo¹
Frederico Ozanam Papa²
José Nicolau P. Puoli Filho³
Gustavo Henrique Araújo¹
José Antônio Dell'Aqua Jr¹
Marco Antonio Alvarenga⁴

RESUMO

A indução farmacológica da ovulação é um procedimento fundamental na maximização e sucesso dos diferentes protocolos com utilização do sêmen eqüino. Ela tem sido amplamente utilizada nas inseminações com sêmen transportado, congelado e na sincronização para transferência de embriões. O hormônio mais utilizado para este fim é o hCG, que quando utilizado em repedidas aplicações promove o desenvolvimento de anticorpos tornando-o ineficiente promotor da ovulação. Fármacos alternativos têm sido desenvolvidos com o intuito de substituir o hCG como indutor de ovulação e, ao mesmo tempo, minimizar efeitos indesejados como promotor de anticorpos. O acetato de deslorelina e o extrato de pituitária eqüina (EPE) são alternativas para sincronizar o momento da ovulação, podendo ser utilizados em vários ciclos consecutivos, sem o inconveniente da formação de anticorpos. O presente estudo comparou a eficiência da administração do extrato de pituitária eqüina em diferentes concentrações e o acetato de deslorelina na indução de ovulação em éguas. Foram utilizados 126 ciclos de 25 éguas, as quais tiveram as ovulações induzidas com 1 mg de acetato de deslorelina (IM), 10 mg de EPE (EV) ou 5mg EPE (EV). Das éguas tratadas com acetato de deslorelina (1mg), 6,9% (2/29) não responderam ao tratamento e foram retiradas da análise da hora média de detecção da ovulação. O tempo médio da ovulação nos grupos tratados com acetato de deslorelina (1 mg), EPE 10 mg e EPE 5mg foram respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ e $37,54 \pm 3,05^b$ horas. Com base nos resultados é possível concluir que ambos os agentes indutores da ovulação sincronizam, com grande eficiência, o tempo de ovulação em até 48 horas, sendo possível utilizar uma dose mais baixa de EPE do que a citada na literatura.

Palavras-chave: égua, acetato de deslorelina, extrato de pituitária eqüina, indução de ovulação

¹ Médica Veterinária, Pós-doutoranda do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP- Botucatu

² Médico Veterinário, Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP.

³ Médico Veterinário, Prof. Assistente Doutor do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18610-000, Botucatu/SP. Autor para correspondência: jnppf@fmvz.unesp.br

⁴ Médico Veterinário, Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP) Botucatu/SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP:18610-000, Botucatu/SP. Autor para correspondência: malvarenga@fmvz.unesp.br

EFFICIENCY OF THE DESLORELIN ACETATE AND EQUINE PITUITARY EXTRACT ON INDUCTION OF OVULATION IN MARES

ABSTRACT

The induction of ovulation is a fundamental procedure to optimize the protocols of artificial insemination success. Ovulation inducing agents have been largely used in artificial inseminations using either cooled or frozen semen, and also to synchronize ovulation and embryo transfer, being hCG the most commonly used, however its efficacy is reduced when it is given repeatedly due to the development of antibodies. Alternative drugs have been developed to replace the hCG and also to reduce the anti-body production. Deslorelin and equine pituitary extract (EPE) can be used to synchronize the moment of ovulation. The present study compared the efficiency of different concentrations of equine pituitary extract and deslorelin to induce ovulation in mares. One hundred and twenty-six cycles from 25 mares were used. Ovulation was induced with 1mg of deslorelin (IM), 10mg of EPE (IV) or 5mg of EPE (IV). Two mares from 29 did not ovulate with deslorelin (6.9%) and were removed from the experiment. The mean ovulation intervals with deslorelin (1mg), EPE (10 and 5mg) were: 38.89 ± 7.38^a , 34.75 ± 6.72^b and 37.54 ± 3.05^b hours respectively. Based on results it is possible to conclude that both agents were efficient to induce ovulation until 48 hours, being possible to reduce the EPE's dose reported in the literature.

Keywords: mare, deslorelin acetate, equine pituitary extract, ovulation induction

LA EFICIENCIA DEL ACETATO DE DESLORELINA Y EL EXTRACTO DE PITUITARIA EQUINA EN LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN YEGUAS

RESUMEN

La inducción farmacológica de la ovulación es un procedimiento importante para la maximización y el éxito de los diferentes protocolos de uso del semen equino. Dicho procedimiento ha sido ampliamente utilizado para la inseminación con semen transportado, congelado y en la transferencia de embriones. La hormona más utilizada para este propósito es hCG, la cual, lleva a la producción de anticuerpos debido a su uso repetitivo, lo que la inutiliza como promotor de la ovulación. Han sido desarrollados fármacos alternativos con el objetivo de sustituir la hCG para inducir la ovulación y, al mismo tiempo, reducir los efectos no deseados como la producción de anticuerpos. El acetato de deslorelina y el extracto de pituitaria equina (EPE) son alternativas para sincronizar la ovulación y puede ser utilizado en varios ciclos consecutivos, sin inducir la formación de anticuerpos. Este estudio comparó la eficacia de la administración de extracto de pituitaria equina en diferentes concentraciones y el acetato de deslorelina para inducir la ovulación en yeguas. Fueron utilizados 126 ciclos, 25 yeguas, cuya ovulación fue inducida con 1 mg de acetato de deslorelina (IM), 10 mg de EPE (EV) o 5mg EPE (EV). De las yeguas tratadas con acetato de deslorelina (1mg), el 6,9% (2/29) no respondieron al tratamiento y fueron excluidas del análisis de tiempo medio para la detección de la ovulación. Los tiempos promedio de ovulación en los grupos tratados con acetato de deslorelina (1 mg), 10 mg de EPE y 5mg EPE fueron, $38,89 \pm 7,38a$ y $34,75 \pm 6,72b$ y $37,54 \pm 3,05b$ horas, respectivamente. Con estos resultados podemos concluir que los agentes inductores de la ovulación funcionaron como sincronizadores eficaces en un periodo máximo de 48 horas y que se puede utilizar una dosis más baja de la EPE que aquella recomendada en la literatura.

Palabras clave: yegua, acetato de deslorelina, extracto de pituitaria equina, inducción de la ovulación.

INTRODUÇÃO

A alta variabilidade na duração do período do estro e a dificuldade em prever o momento exato da ovulação levaram ao desenvolvimento de métodos para o controle do ciclo estral e da ovulação, especialmente para aumentar a performance reprodutiva tanto de garanhões como de éguas durante a estação de monta¹.

O emprego de indutores da ovulação contribui para a melhoria da eficiência reprodutiva, uma vez que viabiliza a redução do período de estro e sincroniza o momento das inseminações, as quais ocorrem num período de até 48 horas após a indução, reduzindo os gastos com o transporte de sêmen refrigerado e otimizando tanto as doses de sêmen congelado, bem como o uso do garanhão.

A maneira mais apropriada para prever o momento de induzir a ovulação consiste na administração de agentes indutores quando um folículo de 33mm de diâmetro é detectado em éguas pôneis e um de 35mm em éguas, período em que o folículo encontra-se responsivo ao LH². Deste modo, após a indução da ovulação, a maioria das éguas ovularão no período correspondente a 36 e 48 horas da indução, demonstrando uma variação individual acentuada, a qual pode estar relacionada ao diâmetro ovulatório de cada animal³.

O hCG tem sido utilizado por muitos anos para diminuir o período de estro e acelerar a ovulação. Sua eficiência é amplamente demonstrada na indução da ovulação quando um folículo pré-ovulatório é detectado. A administração do hCG em éguas com um folículo pré-ovulatório de pelo menos 35mm é capaz de induzir a ovulação em até 48 horas em 80% dos casos⁴.

Apesar de ser um agente indutor de ovulação rotineiramente utilizado, o hCG apresenta a inconveniência de induzir a formação de anticorpos após injeções sucessivas⁵. Roser et al.⁶ encontraram que a formação de anticorpos se inicia após 2 a 5 injeções de hCG. Sullivan et al.⁷ observaram refratariedade ao hCG após a terceira aplicação.

A administração do GnRH sintético durante o estro estimula a liberação de LH e reduz a duração do estro⁸. O desenvolvimento de agonistas e análogos de GnRH aumentou a meia vida deste hormônio por modificações estruturais no GnRH natural, o que permitiu o aumento na concentração de LH por 12 a 24 horas após a aplicação dos mesmos⁴.

Samper et al.⁹ compararam o uso de hCG com um implante de acetato de deslorelina (Ovuplant – Pharmacia and UpJohn Co), nas doses de 2500UI e 2,2mg respectivamente. As éguas foram distribuídas aleatoriamente nos dois grupos e a ovulação foi induzida quando detectado edema uterino com escore entre 2 a 4. O intervalo entre a indução e a ovulação foi maior para as éguas que receberam hCG (28 a 96 horas) em relação às que receberam o acetato de deslorelina (36 a 42 horas). Deste modo, com a utilização da deslorelina é possível reduzir o número de coberturas, sendo de grande auxílio para os programas de transferência de embrião e inseminação artificial, especialmente para sêmen refrigerado e congelado.

Entretanto a utilização de implantes de acetato de deslorelina acarreta uma redução na secreção de FSH durante o período de diestro seguido da ovulação induzida por este agente. A redução da concentração de FSH pode ocasionar uma diminuição do diâmetro folicular, bem como atrasar a emergência de um folículo dominante, aumentando o período interovulatório¹⁰. Para que não ocorra interferência, se faz necessário a remoção do implante 48 horas após sua colocação¹¹, tornando pouco prático a utilização do mesmo.

De acordo com Fleury et al.¹² ao compararem as doses de 1,0; 1,5 e 2,0mg de acetato de deslorelina em veículo de liberação lenta (BioRelease Delivery System) observaram que 90%

das éguas ovularam em até 48 horas da indução da ovulação, sendo o tempo médio de ovulação para os referidos grupos: 44,4; 49,8 e 48,7, respectivamente.

O extrato de pituitária equina tem sido usado em diversos protocolos de superovulação em éguas¹³⁻¹⁸. Duchamp et al.⁵ mostraram que a dose de 50mg de EPE foi eficiente em induzir a ovulação em 86% das éguas, sendo que a dose de 25mg induziu a ovulação em 57% delas.

O extrato de pituitária equina ao contrário do hCG não induz a formação de anticorpos. Entretanto, deve-se levar em consideração a heterogeneidade das amostras de EPE².

O presente estudo comparou a eficiência da administração do extrato de pituitária equina em diferentes concentrações e o acetato de deslorelina na indução de ovulação em éguas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cento e vinte seis ciclos de 25 éguas, sendo 40 ciclos para o Extrato de Pituitária Equina (EPE) 10mg, 57 para EPE 5mg e 29 para 1 mg de acetato de deslorelina (BioRelease, BET Laboratories, Rio de Janeiro, Brasil). As éguas foram rufiadas diariamente e até a detecção do estro. Após a detecção do estro, as fêmeas foram examinadas diariamente por palpação trans-retal e ultra-sonografia, e as ovulações foram induzidas após a detecção de um folículo com 35 mm de diâmetro em associação à presença de edema uterino grau 3. Para a indução da ovulação, as éguas foram tratadas com 1 mg de acetato de deslorelina (BioRelease, BET Laboratories, Rio de Janeiro, Brasil) via intramuscular ou 10 mg de EPE endovenoso. As éguas foram examinadas por palpação e ultra-sonografia trans-retal 24 horas após as aplicações e, a partir deste momento, o monitoramento passou a ser realizado a cada seis horas até a confirmação da ovulação.

Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se os teste ANOVA e de Tukey na avaliação dos intervalos ovulatórios após o momento da indução. Foram retiradas das análises os animais que ovularam em período superior a 48 horas após a indução da ovulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e o desvio padrão do momento de detecção da ovulação após a indução com acetato de 1 mg de deslorelina e 10 mg de EPE foram, respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ horas, com diferença entre esses valores ($P < 0,05$).

Os resultados das ovulações foram agrupados em cinco categorias de acordo com o momento da ovulação: 1) ovulações até 24 horas pós-aplicação, 2) de 24 a 36 horas, 3) 36 a 48 horas, 4) 48 a 60 horas e 5) mais que 60 horas. Os resultados estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem (%) de animais, por grupo, que ovularam em cada intervalo de exames ultra – sonográficos.

	< 24h	24 a 36h	36 a 48h	48 a 60h	> 60h
EPE 10 mg (n=40)	7/40 17,5% ^a	18/40 45% ^a	14/40 35% ^b	1/40 2,5% ^a	—
EPE 5 mg (n=57)	2/57 3,5% ^a	17/57 29,8% ^{ab}	38/57 66,7% ^a	—	—
Deslorelina 1 mg (n=29)	4/29 13,8% ^a	3/29 10,3% ^b	20/29 69% ^a	—	2/29 6,9%

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05)

Em 6,9% (2/29) dos ciclos tratados com o acetato de deslorelina não responderam ao tratamento, e foram retiradas da análise dos dados da hora média de detecção da ovulação. O tempo médio da ovulação nos grupos tratados com acetato de deslorelina e EPE foram, respectivamente, $38,89 \pm 7,38^a$ e $34,75 \pm 6,72^b$ horas, sendo observada diferença estatística entre esses valores (p<0,05).

Os achados obtidos no presente experimento estão de acordo com Samper et al.⁹, os quais constataram que ao utilizarem o acetato de deslorelina, as ovulações foram concentradas entre 36 a 42 horas da indução, demonstrando ser uma alternativa eficiente ao hCG. A utilização de 10 mg de EPE intravenoso concentrou o momento da ovulação entre 24 a 36 horas após a indução. Entretanto, a administração de 5mg de EPE induziu a maioria das ovulações no período compreendido entre 36 a 48 horas (66,6% das éguas). Duchamp et al.⁵ induziram a ovulação com a dose de 50mg de EPE em 86% das éguas, no período entre 24 e 48 horas da administração. O presente estudo obteve uma resposta semelhante com um quinto da dose (10mg de EPE), com 80% de ovulações concentradas no período de 24 a 48h.

A amplitude do intervalo entre a administração e a ovulação pode estar relacionada a uma variação individual na responsividade do folículo ao LH, a despeito da presença de folículos com diâmetro compatível com a indução da ovulação³. Entretanto, tanto o uso do EPE como da deslorelina concentraram as ovulações num período menor do que o descrito na literatura⁹ para o hCG (28 a 96 horas). Tal fato favorece a redução no número de visitas por parte do técnico aos haras para efetuar a palpação retal, sincroniza a doadora e a receptora, além de reduzir o número de inseminações, seja com sêmen fresco, refrigerado ou congelado.

Outra grande vantagem do emprego tanto do acetato de deslorelina, como do EPE na indução da ovulação é a não formação de anticorpos após repetidas administrações, como é o caso do hCG^{5,6}.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que ambos indutores da ovulação sincronizam com grande eficácia o tempo da ovulação. O EPE na dose de 10mg adianta em aproximadamente 4 horas o momento da ovulação em relação ao acetato de deslorelina. A utilização de 5mg do EPE demonstrou-se tão eficiente quanto à de 10mg na indução da ovulação.

AGRADECIMENTOS

BET Laboratories, pelo fornecimento do acetato de deslorelina (BioRelease) e a Schering-Plough pela doação da prostaglandina Ciosin[®].

REFERÊNCIAS

1. Veronesi MC, Battochio M, Faustini M, Gandini M, Cairoli F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. *Domest Anim Endocrinol*. 2003;25:133-40.
2. Palmer E. Induction of ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Febiger; 1993. p.344-7.
3. Samper JC. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. In: *Proceedings of the 43rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 1997, Phoenix. Phoenix, Arizona: AAEP; 1997. p.189-91.
4. Bergfelt DR. Estrous synchronization. mare. In: *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: Saunders; 2000. p.195-228.
5. Duchamp G, Bour B, Combarous Y, Palmer E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J Reprod Fertil*. 1987;35 Suppl:221-8.
6. Roser JF, Kiefer BL, Evans JW, Neely DP, Pacheco CA. The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injections in the cyclic mare. *J Reprod Fertil*. 1979;27 Suppl:173-9.
7. Sullivan JJ, Parker WG, Larson LL. Duration of estrus and ovulation time in non-lactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. *J Am Vet Med Assoc*. 1973;162:895-8.
8. Irvine DS, Downey BR, Parker WG, Sullivan JJ. Duration of oestrus and time of ovulation in mares treated with synthetic GnRH (AY-24,031). *J Reprod Fertil*. 1975;23 Suppl:279-83.
9. Samper JC, Jensen S, Sergenat J. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *J Equine Vet Sci*. 2002;22:320-3.
10. McCue PM, Farquhar VJ, Squires EL. Effect of the GnRH agonist deslorelin acetate on pituitary function and follicular development in the mare. In: *Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 2000, San Antonio. San Antonio, Texas: AAEP; 2000. p.355-6.
11. Farquhar VJ, McCue PM, Carnevale EM, Squires EL. Interovulatory intervals of embryo donor mares administered deslorelin acetate to induce ovulation. *Theriogenology*. 2001;55:362.
12. Fleury J, Fleury P, De Souza FA, Gilley R. Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of Deslorelin (Des) for advancing ovulation in the mare: effects of dose. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:501-2.
13. Douglas RH. Review of induction of suproovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology*. 1979;11:33-46.

14. Douglas RH, Nuti L, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*. 1974;2:133-42.
15. Lapin DR, Ginther OJ. Introduction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with na equine extract. *J Anim Sci*. 1977;44:834-42.
16. Woods GL, Ginther OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology*. 1983;20:347-75.
17. Alvarenga MA, McCue P, Squires EL, Neves-Neto JR. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*. 2001;56:879-87.
18. Alvarenga MA, McCue P, Squires EL, Neves-Neto JR. Improvement of ovarian superstimulation in mares treated with EPE twice daily. *Arq Fac Vet UFRGS*. 1999;27 Suppl:197.

Recebido em: 08/03/10

Aceito em: 29/06/12