

EFEITO DO "PMSG" DE DIFERENTES ORIGENS NA SUPEROVULAÇÃO DE CAMUNDONGOS¹

CARLOS MIGUEL JAUME² e ANA LÚCIA CAMPOS³

RESUMO – Foram superovuladas fêmeas de camundongo com PMSG de diferentes origens: nacional (PMSG-N), da França (PMSG-F), e do Canadá (PMSG-C). Foram estudadas duas curvas de resposta com PMSG-N, utilizando 5, 10 e 20 U.I., uma com embriões coletados no estágio de duas células e a outra com embriões coletados no estágio de mórula. Para ambas as curvas houve um tratamento extra, usando a dosagem menor, no caso de duas células com PMSG-F, e de mórula com PMSG-C. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) no número de estruturas nem no número de embriões viáveis coletados entre as diferentes doses aplicadas de PMSG-N, tanto para os embriões coletados no estágio de duas células como no de mórula. Nos animais que receberam injeção de 5 U.I. de PMSG, houve uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no número de embriões viáveis coletados dos animais que receberam injeção de PMSG-F e PMSG-C, em comparação com os que receberam PMSG-N, e no número de estruturas coletadas entre os animais que receberam PMSG-N e PMSG-C. O número de embriões viáveis coletados com 5 U.I. de PMSG-F e PMSG-C foi duas vezes maior do que o obtido com PMSG-N.

Termos para indexação: gonadotrofina sérica equina, estimulação da ovulação, embriões.

EFFECT OF "PMSG" OF DIFFERENT ORIGINS ON SUPEROVULATION IN MICE

ABSTRACT – Female mice were superovulated with PMSG from different origins: local (PMSG-N), from France (PMSG-F) and from Canada (PMSG-C). Two response curves were studied using 5, 10, and 20 I.U. of PMSG-N, one collecting embryos at the two-cell stage and the other collecting morula. For both response curves there was an extra treatment, using the lowest dose, in the case of collection at the two cell stage, with PMSG-F and in the case of morula with PMSG-C. There was no statistically significant difference ($P > 0,05$) between doses of PMSG-N in number of structures or in number of viable embryos collected, either at the two-cell, or the morula stage of development. In animals injected with 5 I.U. of PMSG, there was a statistically significant ($P < 0,5$) difference in the number of viable embryos collected among animals injected with either PMSG-F or PMSG-C and those injected with PMSG-N, and in the number of structures collected among the animals injected with PMSG-N and PMSG-C. The number of viable embryos collected from animals injected with 5 I.U. of PMSG-F or PMSG-C, was double that obtained injecting PMSG-N.

Index terms: equine serum gonadotrophin, induction of ovulation, embryos.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, para aproveitar mais intensivamente as fêmeas geneticamente superiores dos rebanhos, tem-se utilizado a transferência de embriões. Um dos pontos de estrangulamento para o sucesso da aplicação desta técnica tem sido o baixo número de embriões transferíveis obtidos após a superovu-

¹ Aceito para publicação em 18 de setembro de 1991
Trabalho financiado pelo PADCT-FINEP. Convênio EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e Centro de Biologia da Reprodução, Univ. Fed. de Juiz de Fora (UFJF).

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), Rodovia MG 133, Km 42, CEP 36155, Coronel Pacheco, MG.

³ Biol., EMBRAPA/CNPGL.

lação. A superovulação consiste na estimulação do desenvolvimento de um maior número de folículos e de ovulações durante um ciclo, mediante a aplicação de hormônios gonadotróficos. Na atualidade, o hormônio disponível para provocar a superovulação é uma gonadotrofina sérica eqüina, extraída de éguas gestantes. No entanto, após o uso deste hormônio na superovulação de bovinos neste laboratório, foi observado que a maior parte das estruturas coletadas não eram viáveis. Isto resultou num número muito pequeno de embriões transferíveis, menor inclusive do que consta da literatura internacional, usando esse tipo de hormônio. Esta diferença poderia ser, no entanto, devida ao tipo de animal, a diferenças nas condições ambientais, à natureza subjetiva da classificação dos embriões, ou a diferenças no hormônio utilizado.

A superovulação em camundongos tem sido estudada por vários autores (Fowler & Edwards 1957, McLaren 1967, Gates 1971). A dose de PMSG recomendada para produzir a superovulação é de 5 U.I. (Gates 1971).

O presente trabalho teve a finalidade de testar a existência de alguma diferença na superovulação provocada pela gonadotrofina de soro de égua prenhe disponível no mercado nacional e a de outros países.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas fêmeas F_1 resultantes do cruzamento de camundongos das linhagens C57 e Suçco da colônia do Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos num regime de quatorze horas de luz e dez horas de escuridão. As fêmeas foram superovuladas com três semanas de idade com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de gonadotrofina sérica eqüina (PMSG), e, 48 horas após, com uma injeção i.p. de gonadotrofina coriônica humana (HCG: Pregnyl, Lab. Organon). As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente, nos diferentes tratamentos, de acordo com o delineamento experimental apresentado na Tabela 1. Foram estudadas duas curvas de resposta com PMSG-N, utilizando-se 5, 10 e 20 U.I., uma com embriões coletados no estágio de duas células, e a outra, com embriões coletados no estágio

de mórula. Para comparar os efeitos de gonadotrofinas de diferentes origens, houve um tratamento extra com a dosagem menor para cada curva, com PMSG-F, no caso de duas células, e com PMSG-C, no caso de mórula (Tabela 1).

Após a injeção de HCG, as fêmeas foram imediatamente acasaladas em gaiolas individuais, com machos suços de fertilidade comprovada. Os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, no segundo ou quarto dia após HCG, para obtenção de embriões de duas células ou mórula, respectivamente. Os cornos uterinos junto com os ovidutos foram dissecados e colocados numa placa-de-pertri contendo solução salina com tampão fosfato (PBS), segundo Whittingham (1971), suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio de cultura utilizado para a coleta e manipulação dos embriões). Os ovidutos e cornos uterinos foram lavados mediante o uso de uma seringa acoplada a uma agulha hipodérmica 10 x 3 sob um microscópio estereoscópico. A ponta da agulha foi introduzida no infundíbulo e os embriões foram levados em direção ao corno uterino com PBS. As estruturas coletadas foram lavadas com PBS e classificadas de acordo com seu aspecto morfológico em: **a)** transferíveis ou viáveis e **b)** não viáveis ou degenerados.

Os dados foram analisados pelo pacote software científico (SOC) (Paniago et al. 1989), utilizando o

TABELA 1. Delineamento experimental

Tratamento	Dose (U.I.)	Estádio de desenvolvimento dos embriões e tipo de PMSG	
		2 células	Mórula
A	5	PMSG-F *	-
B	5	PMSG-N **	-
C	10	PMSG-N	-
D	20	PMSG-N	-
E	5	-	PMSG-C +
F	5	-	PMSG-N
G	10	-	PMSG-N
H	20	-	PMSG-N

* PMSG-F (Folligon, Laboratório Intervet, França).

** PMSG-N (Maturon, Laboratório Organon, Brasil).

+ PMSG-C (Equinex, Laboratório Ayerst, Canadá).

módulo modlin, ajustando-se um modelo inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os embriões foram coletados no estádio de duas células, foram obtidos, em média, para as doses de 5, 10 e 20 U.I. de PMSG-N, 15,1, 21,1 e 17,1 estruturas por animal, sendo que, destas, 10,3 (66,9%), 13,4(63,6%) e 8,1 (47,7%) eram estruturas viáveis, respectivamente (Tabela 2). Já para o estádio de mórula, foram obtidos, em média, 14,5, 17,4 e 16,0 estruturas por animal, das quais 10,5 (72,7%), 8,2(47,3%) e 7,5(46,9%) eram estruturas viáveis (Tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre as doses dentro das curvas, nem entre as curvas, tanto para o número de estruturas totais como para o número de embriões viáveis, nos animais que receberam injeção de 5, 10 e 20 U.I. de PMSG-N e coletados no estádio de duas células e de mórula.

Os resultados da dose de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-F, obtidos no estádio de duas células, foram, respectivamente,

15,2 \pm 3,6 e 28,5 \pm 9,1 estruturas, sendo que, destas, 10,3 \pm 1,6 (70,8% \pm 14,9) e 19,5 \pm 2,0 (76,6% \pm 25,4) eram viáveis (Tabela 4). Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no número de embriões viáveis, mas não no número total de estruturas, coletadas no estádio de duas células entre os animais em que foi injetada a dose de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-F.

Para o estádio de mórula, os resultados obtidos com a dose de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-C foram, respectivamente, 14,4 \pm 5,8 e 43,2 \pm 11,7 estruturas, sendo, destas, 10,6 \pm 1,1 (80,5 \pm 17,9) e 24,0 \pm 2,9 (58,2% \pm 10,2) viáveis (Tabela 5). Houve uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no número total de estruturas e no número de embriões viáveis coletados no estádio de mórula entre os animais que receberam injeção de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-C.

Os resultados obtidos utilizando 5 U.I. de PMSG-F (estádio de duas células) e de PMSG-C (estádio de mórula) foram, respectivamente, 28,5 \pm 9,1 e 43,2 \pm 11,7 estruturas, sendo 19,5 \pm 2,0 (76,6% \pm 25,4) e 24,0 \pm 2,9 (58,2% \pm 10,2) viáveis (Tabela 6). Não foi

TABELA 2 - Efeito de diferentes doses de PMSG-N sobre o número de estruturas e a qualidade de embriões (média \pm DP) coletados no estádio de duas células.

Dose (U.I.)	Número de animais	Estruturas por animal	Embriões viáveis por animal	Embriões viáveis por animal (%)
5	16	15,2 \pm 3,6	10,3 \pm 1,6	70,8 \pm 14,7
10	16	21,8 \pm 3,6	14,1 \pm 3,8	63,8 \pm 9,3
20	15	16,5 \pm 3,6	8,2 \pm 3,3	53,9 \pm 26,1

TABELA 3 - Efeito de diferentes doses de PMSG-N sobre o número de estruturas e a qualidade de embriões (média \pm DP) coletados no estádio de mórula.

Dose (U.I.)	Número de animais	Estruturas por animal	Embriões viáveis por animal	Embriões viáveis por animal (%)
5	31	14,4 \pm 5,8	10,6 \pm 1,1	80,5 \pm 17,9
10	14	18,3 \pm 7,5	8,8 \pm 4,1	49,6 \pm 14,6
20	14	16,2 \pm 4,0	7,7 \pm 4,3	43,4 \pm 16,6

TABELA 4 - Efeito da dose de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-F sobre o número de estruturas e a qualidade dos embriões (média \pm DP) coletados no estágio de duas células.

Hormônio	Número de animais	Estruturas por animal	Embriões viáveis por animal	Embriões viáveis por animal (%)
PMSG-N	16	15,2 \pm 3,6	10,3 \pm 1,6	70,8 \pm 14,9
PMSG-F	12	28,5 \pm 9,1	19,5 \pm 2,0	76,6 \pm 25,4

TABELA 5 - Efeito da dose de 5 U.I. de PMSG-N e PMSG-C sobre o número de estruturas e a qualidade dos embriões (média \pm DP) coletados no estágio de mórula.

Hormônio	Número de animais	Estruturas por animal	Embriões viáveis por animal	Embriões viáveis por animal (%)
PMSG-N	31	14,4 \pm 5,8	10,6 \pm 1,1	80,5 \pm 17,9
PMSG-C	24	43,2 \pm 11,7	24,0 \pm 2,9	58,2 \pm 10,2

TABELA 6 - Efeito da dose de 5 U.I. de PMSG-F e PMSG-C sobre o número de estruturas e a qualidade dos embriões (média \pm DP) coletados no estágio de duas células e mórula.

Hormônio	Número de animais	Estruturas por animal	Embriões viáveis por animal	Embriões viáveis por animal (%)
PMSG-F	12	28,5 \pm 9,1	19,5 \pm 2,0	76,6 \pm 25,4
PMSG-C	24	43,2 \pm 11,7	24,0 \pm 2,9	58,2 \pm 10,2

detectada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), nem no número de estruturas totais nem no número de embriões viáveis coletados.

A ausência de diferença estatisticamente significativa entre as diferentes doses injetadas de PMSG-N no número de estruturas e no número de embriões viáveis coletados no presente experimento, junto com a tendência observada de diminuir a percentagem de embriões viáveis, à medida que aumentava a dose de hormônio aplicado, e o fato de que o número de embriões viáveis obtidos não difere do número de crias que são obtidas no processo normal de reprodução neste biotério (8-12 crias por ninhada), indica que este hormônio não é adequado para provocar a superovulação de camundongos. Isto poderia oferecer uma

explicação do baixo número de embriões viáveis obtidos neste laboratório quando se utilizou este hormônio para estimular a superovulação em bovinos.

O fato de não haver detectado diferença estatisticamente significativa entre os embriões coletados no estágio de duas células e de mórula, tanto no número de estruturas como no número de embriões viáveis, indica que não há influência do dia da coleta (segundo ou quarto dia após HCG) sobre o resultado da superovulação.

O PMSG é uma glicoproteína composta de duas subunidades diferentes e que possuem atividade biológica semelhante ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH). Além do mais, pode possuir um conteúdo variável de carboidratos e de

ácido que, possivelmente, modifica a relação de atividade tipo FSH e LH do hormônio (Papkoff 1974, 1978, 1981).

É provável que a fonte de soro utilizada para a fabricação de PMSG-N seja um soro com uma atividade gonadotrófica inadequada para provocar a superovulação, visando a produção de embriões viáveis para transferência. A medida que aumentou a dose de PMSG-N, diminuiu a porcentagem de embriões viáveis, tanto para os coletados no estágio de duas células como de mórula.

CONCLUSÕES

1. O uso da gonadotrofina sérica equina adquirida no mercado nacional para a superovulação de camundongos não foi eficaz no aumento do número de embriões viáveis coletados por fêmea superovulada.

2. Ambas as gonadotrofinas séricas equinas estrangeiras testadas resultaram num número maior de embriões viáveis por fêmea superovulada do que nos animais tratados com a gonadotrofina disponível no mercado nacional. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de estruturas, nem no número de embriões viáveis coletados entre o estágio de duas células e de mórula.

AGRADECIMENTOS

À Chefe do biotérico, Dra. V. M. Peters e aos seus funcionários, pelo fornecimento e cuidado dos camundongos.

REFERÊNCIAS

- FOWLER, R. E.; EDWARDS, R. G. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. **Journal of Endocrinology**, v.15, p.374-384, 1957.
- GATES, A. H. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: DANIEL JUNIOR, J. C. (Ed.) **Methods in mammalian embryology**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1971. p.64-75.
- McLAREN, A. Factors affecting the variation in response of mice to gonadotrophic hormones. **Journal of Endocrinology**, v.37, p.147-154, 1967.
- PANIAGO, C. F. A.; ANDRADE, D. F.; TSURUTA, J. H.; CAMARGO NETO, J.; MOURA, M. F.; FESTA, M. N.; PEDROSO JUNIOR, M.; PACHECO, O. I. P.; EVANGELISTA, S. R. M.; TERNES, S. **Software Científico (SOC)**. Campinas: NTIA, 1989.
- PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotrophin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.58, p.397-404, 1974.
- PAPKOFF, H. Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. In: SREENAN, M. M. (Ed.) **Current Topics in Veterinary Medicine**. The Hague: M. Nijhoff, 1978. p.195-224.
- PAPKOFF, H. Variations in the properties of equine chorionic gonadotrophin. **Theriogenology**, v.15, p.1-11, 1981.
- WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature-London**, v.233, p.125-126, 1971.