

José Renato Laino Martinelli Cury

EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P36,
ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO DE eCG OU LH, EM ANIMAIS
DA RAÇA NELORE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação do Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Co-Orientador: Dr. Ronaldo Luiz Ereno

BOTUCATU - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cury, José Renato Laino Martinelli.

Eficiência do protocolo superestimulatório P36, associado à administração de eCG ou LH em animais da raça Nelore /José Renato Laino Martinelli Cury. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ciro Moraes Barros

Co-orientador: Ronaldo Luiz Ereno

Capes: 21001006

1. Zebu - Reprodução. 2. Nelore (Zebu) - Embrião. 3. Transferência de embriões.

Palavras-chave: *Bos indicus*; eCG; FSH; LH; Nelore; Superovulação; Transferências de embriões.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	12

CAPÍTULO 1

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	21
REVISÃO DE LITERATURA.....	24
REFERÊNCIAS.....	34

CAPÍTULO 2

Resumo.....	50
1. Introdução	51
2. Materiais e métodos.....	53
3. Resultados	58
4. Discussão.....	60
5. Referências.....	63

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado essa grande oportunidade.

Aos meus pais José Carlos e Maria Alice por todo apoio e incentivo dispensados a mim.

Ao meu irmão Luis Fernando por todo incentivo nesta luta.

Aos meus avôs, Flavio, Cida e Diva por toda ajuda e incentivo durante esses anos, a minha tia Fatima e meu primo Gabriel pelos momentos agradáveis e pelo carinho indispensável de sempre.

Aos meus amigos de Piraju, Alexandre, Bruno, Benedito, Matheus, Thiago, Leandro, grandes amigos que já que fazem parte da família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, pela oportunidade em me acolher em seu laboratório, pela oportunidade de me orientar na execução e pela paciência e dedicação que foram fundamentais para realização deste trabalho de grande importância para minha formação.

Ao meu Co-Orientador Dr. Ronaldo Luiz Ereno que me auxiliou durante a realização do experimento e a dissertação sua participação foi fundamental para realização deste trabalho.

Ao grande amigo Eduardo Lucacin que me auxiliou no experimento e me acolheu em sua fazenda prestando todo auxílio necessário para a realização do experimento.

À Família do Sr Luiz e Sra Eli Lucacin: Davi, Polaca, Natalia, Ana Luiza, Luiz, Simone, Victor, Emanuele, por me receberem em sua casa como um membro da família e também as boas conversas dos almoços de domingo.

Aos novos amigos que me acolheram em Moreira Sales durante o experimento: Sra Dinha, Joelma, Carolina, Paulinho, Jossely, Sr Décio.

Aos amigos de pós-graduação de Botucatu, Rafael, Eduardo, Janahi, Rafaela, Mariana, Paula, Marcelo Pegorer, Anthony, Barbara, Mauricio, Leonardo, Patricia, Antonio (Kaka), Diego, Raquel, por toda ajuda prestada, pela amizade e os bons momentos juntos.

Ao amigo Vinicius Gonçalves Pinheiro, um grande irmão, por todo apoio, incentivo e por ser um exemplo de competência e dedicação, sempre me mostrando o caminho correto.

À todos os funcionários da Fazenda e Haras Simone: Sr. Manoel, Leonel, Leopoldo, Alexandre (Gordo), Renato, Sra Teresa, Janete, por auxiliarem de uma forma direta ou indireta no experimento e também pelos bons momentos de trabalho junto.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências – UNESP- BOTUCATU): Luiz Antonio de Oliveira, Paulo César Mioni, Janete Teixeira, Ana Cristina Murcia de Souza. Muito obrigado por toda amizade e os bons momentos juntos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço ainda todos aqueles, demais professores e amigos, que de uma maneira ou outra contribuíram para minha formação acadêmica, e pelo aprendizado.

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – benzoato de estradiol

CL – corpo lúteo

DIP– dispositivo intravaginal contendo progesterona

eCG – gonadotrofina coriônica equina

EPM - erro padrão da média

FD - folículo dominante

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

IA – inseminação artificial

IATF – inseminação artificial em tempo fixo

IM - via intramuscular

LH – hormônio luteinizante

mg – miligramas

MHz - megahertz

mm - milímetros

PBS - tampão fosfato-salina

pFSH - hormônio folículo estimulante de pituitária suína

PGF_{2α} - prostaglandina F_{2α}

pLH - hormônio luteinizante de pituitária suína

PMSG - gonadotrofina sérica da égua prenhe

P4 - progesterona

SOV- superovulação

TE – transferência de embriões

UI - unidade internacional

US – ultrassom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tratamento	superestimulatório	utilizado	no	grupo	
	Controle.....					45
Figura 2 -	Tratamento	superestimulatório	utilizado		grupo	
	P36.....					46
Figura 3 -	Tratamento	superestimulatório	utilizado	no	grupo	
	P36/eCG.....					47
Figura 4 -	Tratamento	superestimulatório	utilizado	no	grupo	
	P36/FSH+LH.....					48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de folículos (média $\pm$ EPM) nos dias 4 (início do tratamento superestimulatório), 6 (aplicação de PGF _{2α}) e 8 (aplicação de LH), em vacas Nelore superestimuladas dos grupos: controle, P36, P36/eCG e P36/FSH+LH.....	58
Tabela 2 -	Taxa de ovulação (%), número de corpos lúteos, estruturas totais colhidas, embriões viáveis, taxa de viabilidade (%), porcentagem de estruturas totais colhidas em relação ao número de CL, em vacas Nelore superestimuladas. Os dados estão representados por média $\pm$ EPM.....	59
Tabela 3 -	Porcentagem de embriões (média $\pm$ EPM) classificados como GI, GII, GIII e embriões degenerados de acordo com suas características morfológicas.....	60

CAPÍTULO 1

Resumo

Abstract

Introdução e Objetivos

Revisão de Literatura

Referências

RESUMO

O protocolo denominado P36 tem sido amplamente utilizado para induzir ovulação múltipla e permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) facilitando o manejo de doadoras de embriões. Estudos recentes com o P36 indicam que a substituição das duas últimas doses de FSH por eCG pode melhorar a produção de embriões, possivelmente por sua atividade LH. Objetiva-se com o presente trabalho comparar o protocolo P36 com o tratamento superestimulatório convencional (com observação do estro) e testar, em vacas da raça Nelore, a substituição da eCG pela aplicação simultânea de FSH e LH no último dia de tratamento superestimulatório. Vacas Nelore (n=16) foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: superovulação convencional com observação de estro (Controle), P36, P36/eCG e P36/FSH+LH. Os tratamentos foram feitos em modelo cross-over, ou seja todos os animais passaram pelos 4 tratamentos. No grupo Controle, o tratamento superestimulatório iniciou 10 dias após a observação do estro. As aplicações de FSH foram feitas durante 4 dias consecutivos (133mg, IM), duas vezes ao dia em doses decrescentes. Dois dias após o início do tratamento as doadoras receberam uma dose luteolítica de d-cloprostenol (150µg, IM). As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após a detecção do estro. No grupo P36, em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g) e benzoato de estradiol (3 mg, IM). O FSH (133mg, IM) foi administrado em doses decrescentes, 2 vezes ao dia durante o D4 ao D7. No D6, foi aplicado d-cloprostenol (150µg, IM) e o dispositivo intravaginal foi removido 36h mais tarde. No dia 8, a ovulação foi induzida com 12,5mg de pLH e os animais foram inseminados artificialmente em tempo pré-determinado, sem a observação de estro, 12 e 24 horas após a aplicação de pLH. As vacas do grupo P36/eCG foram tratadas de forma semelhante ao P36, exceto que as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 200UI de eCG (totalizando 400UI, IM). O protocolo do P36/FSH+LH foi semelhante ao grupo P36, porém, juntamente com as duas últimas doses de pFSH, os animais também receberam duas doses de 1,0mg de pLH (2mg, via IM). A coleta de embriões foi realizada 7 dias após a IA. Os dados foram analisados por ANOVA

(Proc GLM, SAS). O tratamento P36/ FSH+LH diminuiu o número de embriões viáveis ($0,32 \pm 0,46$) quando comparado aos demais tratamentos: Controle ($1,73 \pm 0,48$), P36 ($2,07 \pm 0,48$) e P36/eCG ($1,76 \pm 0,46$). Conclui-se que o protocolo P36/FSH+LH não é indicado para induzir ovulações múltiplas em vacas da raça Nelore.

Palavras-chave: FSH, LH, eCG, transferências de embriões, superovulação, Nelore, *Bos indicus*.

ABSTRACT

The P36 protocol has been widely used to induce multiple ovulation and allow for fixed-time artificial insemination (FTAI) facilitating the management of embryo donors. Recent studies with the P36 protocol indicate that the replacement of the last two doses of FSH by eCG can improve embryo yield, possibly due to its LH activity. The objective of this study was to compare the P36 protocol with conventional superestimulatory treatments (with estrus observation) and to test, in Nelore cows, the replacement of eCG by the simultaneous administration of FSH and LH on the last day of the superstimulatory treatment. Nelore cows (n=16) were randomly distributed into four groups: conventional superovulation with estrus observation (control); P36; and P36 / eCG P36 / FSH+LH. The treatments were performed in a crossover model, i.e. all animals passed through the four treatments. In the control group, the superstimulatory treatment started 10 days after estrus observation. Administration of FSH was made in 4 consecutive days (133 mg, IM), twice daily in decreasing doses. Two days after the initiation of treatment donors received a luteolytic dose of d-cloprostenol (150 µg, IM). Insemination was performed 12 and 24 h after estrus observation. In the P36 group, in a random day of estrous (D0), donors received a progesterone intravaginal device (1.0 g) and estradiol benzoate (3.0 mg, IM). The FSH (133 mg, IM) was administered at decreasing doses, twice daily from D4 to D7. In D6, d-cloprostenol was administered (150 µg, IM) and the intravaginal device was removed after 36 h. On day 8, ovulation was induced with 12.5 mg of pLH and the FTAI was performed at 12 and 24 h after pLH administration. Cows from the P36/eCG group were treated similarly to P36 group, except that the last two doses of FSH were replaced by two doses of 200 IU of eCG (total of 400 IU, IM). The protocol of P36 / FSH+LH group was similar to P36 group, however, with the last two doses of pFSH, animals also received two doses of 1.0 mg pLH (2 mg, IM). The collection of embryos was performed 7 days after AI. Data were analyzed by ANOVA (Proc GLM, SAS). The treatment P36 / FSH+LH reduced the number of viable embryos (0.32 ± 0.46) when

compared to other treatments: control (1.73 ± 0.48), P36 (2.07 ± 0.48) and P36/eCG (1.76 ± 0.46). In conclusion, the protocol P36 / FSH + LH is not indicated to induce multiple ovulation in Nelore cows.

Keywords: FSH, LH, eCG, embryo transfer, superovulation, Nelore, *Bos indicus*.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido a maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (*Bos taurus*). O rebanho de corte brasileiro (cerca de 205 milhões de cabeças, IBGE, 2009) é composto em sua maior totalidade por animais da raça Nelore (ACBN, 2008), criado principalmente em regime extensivo. O emprego de biotecnologias, tais como a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE), ainda é pouco empregado em animais da raça Nelore, devido a dificuldade de observação do cio (requer mão de obra treinada) aliado curta duração de estro dessas fêmeas e com alta incidência de manifestação noturna (Pinheiro et al., 1998).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular das fêmeas bovinas (Savio et al., 1988; Sirios e Fortune, 1988; Ginther et al., 1989) tornou-se possível o desenvolvimento de protocolos de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, permitindo que a inseminação artificial seja realizada em tempo fixo (IATF), ou seja sem a observação de cio (Barros et al., 1998; Bó et al., 2003; Ereno et al., 2007).

Segundo o relatório da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS, 2009), apesar da crescente produção brasileira de embriões *in vitro* (256.000), foram produzidos 42.000 embriões *in vivo* (Stroud e Bó, 2009), o que projeta aproximadamente 12.000 superovulações por ano realizadas na América do Sul. Esses resultados destacam o Brasil no cenário mundial de produção de embriões.

Entretanto, os resultados obtidos nos tratamentos superestimulatórios continuam sendo variáveis e imprevisíveis, devido a inconstância na resposta supervolatória, na taxa de fertilização e desenvolvimento dos embriões (Armstrong, 1993; Boland e Roche, 1993; Adams, 1994; Barros e Nogueira, 2001; Baruselli et al., 2006). Esta variação individual a SOV foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos indicus*, Baruseli et al., 2003) quanto em vacas Holandesas (*Bos taurus*, Martins, 2005).

Dentre os tratamentos superovulatórios utilizados em raças zebuínas, destaca-se o protocolo P36 proposto por Barros & Nogueira (2001) no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF_{2α} (daí a denominação P36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a administração desta gonadotrofina (Nogueira & Barros, 2003). Consequentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do estro das doadoras.

Em fêmeas *Bos taurus* o P36 não se mostrou tão eficaz quanto em vacas *Bos indicus* (Baruselli et al., 2006). Estes dados motivaram ajustes no protocolo P36, onde a administração do indutor de ovulação foi atrasada em 12 horas, tornando-o eficaz também em raças europeias (Martins et al., 2005; Chesta et al., 2007).

Na tentativa de aumentar a produção de embriões, Barcelos et al. (2006) testaram a possibilidade de substituir as duas últimas doses de FSH por eCG no protocolo P-36. A eCG, é uma gonadotrofina que possui atividade FSH e LH e portanto poderia estimular a maturação folicular final após a fase de desvio folicular quando ocorre a transição da dependência de FSH para LH. Os resultados positivos obtidos por Barcelos et al. (2007) com o uso de eCG no protocolo P-36 na raça Nelore, foram confirmados na raça Sindi (Mattos et al., 2011) e Brangus (Reano et al., 2009).

Dando continuidade ao trabalho de Barcelos, Rosa (2010, na raça Angus) e Oliveira (2011, na raça Nelore) testaram a substituição da eCG por LH, no último dia do tratamento superestimulatório. Observaram que a aplicação de apenas LH no último dia do tratamento superestimulatório, diminuía (Rosa, 2010) ou não promovia alteração (Oliveira, 2011) na produção de embriões. No entanto, quando o LH foi administrado juntamente com as duas últimas doses de FSH em vacas Angus, (P36/FSH+LH), a produção de embriões viáveis foi comparável ao observado em doadoras tratadas com o protocolo P36/eCG. Estes resultados indicam que é possível substituir a eCG por

FSH+LH, no último dia do tratamento do protocolo superestimulatório P36, na raça Angus (Rosa, 2010).

Objetiva-se com o presente trabalho comparar o protocolo P36 com o tratamento superestimulatório convencional (com observação do estro) e testar, em vacas da raça Nelore, a substituição da eCG pela aplicação simultânea de FSH e LH no último dia de tratamento superestimulatório.

A hipótese a ser testada é que a aplicação de LH e FSH no último dia do tratamento superestimulatório, aumenta a taxa de ovulação, a qualidade e a quantidade de embriões viáveis produzidos.

REVISÃO DE LITERATURA

Foliculogênese

Admite-se que o início da foliculogênese em fêmeas mamíferas ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oôgonias. Estas diferenciam-se em oócitos (iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I até o recrutamento folicular), os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais. Esses folículos representam a fonte da qual serão recrutados os folículos para o crescimento durante toda a vida, sendo que os ovários pareados de um indivíduo contém em torno de 350.000 a 1.100.000 desses folículos no nascimento (humanos: Gougeon, 1996) e de 16.000 a 240.000 em bovinos (Erickson, 1995).

Uma vez iniciado o crescimento dos folículos primordiais, as células da granulosa se proliferam para formar estruturas multilaminares (folículos pré antrais, Turnbull et al., 1977). O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento pré-antral é controverso. Receptores de FSH (FSHR) podem ser detectados em folículos primários bovinos (Wandji et al., 1992) e estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançado pela adição de FSH ao meio de cultura. Entretanto, considera-se que o FSH desempenha um papel permissivo ao invés de regulador neste estágio de desenvolvimento (Webb et al., 2003). Alternativamente, o início e a regulação do desenvolvimento folicular pré antral são predominantemente conduzidos por fatores produzidos localmente (McNatty et al., 1999). O oócito tem um papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (Gilchrist et al., 2004).

Recrutamento Folicular

Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente do suporte de gonadotrofinas. Em várias espécies domésticas, os folículos antrais são recrutados e crescem simultaneamente sob o controle das gonadotrofinas (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2003).

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas. Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de 3 dias (Ginther et al., 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados, Lucy et al., 1992), estabelecendo-se então, o fenômeno denominado de desvio folicular. Neste momento o diâmetro médio do maior folículo é 8,5mm para *Bos taurus* (Holandês, Ginther et al., 1996) e de 6,0mm para *Bos indicus* (Nelore, Sartorelli et al., 2005, Gimenes et al., 2008; Ereno, 2008) Após o desvio de crescimento folicular, e na presença de altos níveis de progesterona que inibe o pico pré ovulatório de LH o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir deste momento começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (Ginther et al., 1989; Webb et al., 2004). Por outro lado, se o folículo dominante estiver presente no momento da regressão luteínica, ocorrerá ovulação do mesmo (Fortune et al., 2004).

A emergência da onda de crescimento folicular, coincide com um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, responsável pelo recrutamento de um grupo de folículos antrais menores que 4 mm de diâmetro (Fortune et al., 2001; Mihm & Austin, 2002), com média de crescimento semelhantes entre si (Gastal et al., 2004) durante aproximadamente 2 a 3 dias (Jaiswall et al., 2004). Aproximadamente 20 a 30 folículos emergem em cada onda folicular. Boa parte deles tem o potencial de atingir o estágio pré ovulatório, fato que pode ser demonstrado pela possibilidade de estimular o

crescimento e a ovulação de vários folículos através da administração de gonadotrofinas (Adams, 1994). Além da ação das gonadotrofinas, também se tornou evidente que fatores de crescimento produzidos localmente constituem moléculas estimuladoras e reguladoras chave para os folículos antrais, atuando por meio de mecanismos parácrinos e endócrinos (Webb et al., 2003; Fortune et al., 2004).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma particularidade observada é que em zebuínos há maior incidência de 3 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Figueiredo et al., 1997; Gambini et al., 1998; Viana et al., 2000; Mollo et al., 2007) enquanto em taurinos ocorre o padrão de 2 ondas (Sávio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Wolfenson et al., 2004). Em geral, o *Bos indicus* apresenta maior número de folículos recrutados durante a onda folicular em relação ao *Bos taurus* (revisto por Sartori e Barros, 2011).

Tratamentos para induzir múltiplas ovulações

Entre os agentes superestimulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou (PMSG) que é produzida pelos cálices endometriais da égua prenhe entre os dias 40º a 120º de gestação (Combarnous, 1992). Quando administrada em outras espécies a eCG pode exercer atividade tanto de FSH como de LH, sua meia vida é longa (40 horas), persiste por até 10 dias na circulação de fêmeas bovinas devido à proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente na sua molécula (Dieleman et al., 1993) e também possui alto peso molecular o que dificulta a sua filtração glomerular (revisado por Souza, 2008). Por esse motivo ela pode ser administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Alfurajji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994).

Outro agente empregado na SOV é o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou

ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993). O uso do FSH foi amplamente estudado como agente indutor de superovulação. Essas pesquisas envolviam dose, eficiência de produtos comerciais e as variações nos índices FSH:LH de diferentes produtos comerciais (Donaldson e Ward, 1987; Donaldson, 1990). Estes trabalhos caracterizaram a diferença de potência do FSH (Braileanu et al., 1998) e a variação da relação FSH:LH existente entre diferentes produtos comerciais e dentro de um mesmo produto. Altas concentrações de LH promovem um efeito negativo relacionado à qualidade e produção embrionária bovina, demonstrado por Willmot (1990), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (2002). A partir desses trabalhos sugeriu-se que o máximo de contaminação de LH no FSH seja de aproximadamente 15 a 20%. Devido ao FSH ter uma meia vida curta (estimada em 5 horas ou menos), há a necessidade de 2 aplicações diárias (Monniaux et al., 1983) durante 4 dias consecutivos para induzir SOV (Barros & Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006).

Vários tratamentos para induzir múltiplas ovulações (SOV) foram propostos nos últimos anos (Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010). Um dos primeiros protocolos de superovulação utilizava o cio natural como referência. O tratamento superovulatório iniciava-se entre os dias 8 a 12 após a manifestação do estro, coincidindo com o início da emergência da segunda onda folicular. (Mapletoft et al., 2002).

Existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório pode diminuir a produção de embriões (Guibault et al., 1991; Lussier et al., 1995). A fim de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos, algumas estratégias foram desenvolvidas, como por exemplo, começar a superestimulação com FSH no início do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas

(Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996) e sincronizar o início da emergência das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

Já foi amplamente demonstrado que o uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais e implantes auriculares), associada à administração intramuscular de estrógeno, promove atresia dos folículos e origina uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início do tratamento (revisto por Bó et al., 1995, 2003). Diante a estes dados e a fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da onda folicular, ou seja, 4 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 12 horas mais tarde a fonte de P4 é removida. As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens, pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, a detecção do cio para IA das doadoras ainda é necessária.

Observou-se que nem todos os folículos que respondiam aos tratamentos de SOV ovulavam, possivelmente por não terem se desenvolvido normalmente ou por não possuírem quantidade suficiente de receptores de LH para responderem ao pico pré-ovulatório de LH (Xu et al., 1995; D'Occhio et al., 1997; Liu et al., 1998). Portanto, estratégias que atrasam o pico pré-ovulatório de LH foram utilizadas na tentativa de aumentar o número de embriões (D'Occhio et al., 1997; Van de Leemput et al., 2001) ou ainda para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (Barros & Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006).

Barros & Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e esta foi induzida pela administração de pLH ou GnRH. Estes protocolos não aumentaram significativamente

o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro (Barros e Nogueira 2001). Porém, estes tratamentos permitiram controlar o momento da ovulação, possibilitando a utilização da IATF. A partir destes experimentos desenvolveu-se um novo protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001 e 2005), no qual a fonte de P4 (CIDR-B® ou DIB®) é mantida por até 36 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de P4 (ou seja, 48 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de pLH (Nogueira et al., 2003) a IATF é realizada 12 e 24 horas após a aplicação desta gonadotrofina, evitando a inconveniência da detecção do estro.

Alguns estudos foram realizados na tentativa de se obter a dose ideal tanto do LH como de FSH nos tratamentos de SOV. Já foi demonstrado que a redução da dose de 25 para 12,5 mg de pLH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis ($9,8 \pm 1,09$, e $9,2 \pm 0,77$, respectivamente) ou a taxa de viabilidade (73,7 e 69,5%, respectivamente; Nogueira et al., 2007). Ree et al. (2009) observaram em animais *Bos taurus*, diminuição nas taxas de ovulação (32, 58 e 84%) proporcional a dose de LH utilizada (8, 12,5 e 25mg, respectivamente), indicando a necessidade do emprego de doses mais elevadas de pLH nas raças européias (*Bos taurus* 25mg) em comparação com as preconizadas na raça Nelore (*Bos indicus*).

Baruselli et al. (2003), avaliaram diferentes doses de Folltropin-V (100, 133 e 200mg). Os resultados indicaram que é possível reduzir a dose de Folltropin-V para 100mg em doadoras Nelore, sem comprometer a resposta superovulatória e a qualidade embrionária.

A eficácia do protocolo P36 já está demonstrada na raça Nelore (Baruselli et al., 2006; Nogueira et al., 2007; Barros et al., 2010), porém em *Bos taurus*, algumas modificações foram necessárias, devido a baixa taxa de recuperação de embriões

nesses animais (Baruselli et al., 2006). A discrepância nesses resultados pode ser atribuída pelas particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* (Sartori et al., 2010).

Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente quando os folículos atingem diâmetro acima de 10 mm enquanto que *Bos indicus* essa resposta é obtida com folículos ao redor de 8mm (Gimenes et al., 2008; Simões et al., 2012). A capacidade ovulatória e a expressão de LHR nas células da granulosa estão relacionadas ao aumento do diâmetro folicular (Simões et al., 2012). Considerando esses dados, poderia se esperar que protocolos nos quais, a administração do indutor da ovulação (pLH ou GnRH) fosse atrasada em 12 horas (P36/LH60), seriam mais efetivos em fêmeas taurinas do que o protocolo P36/LH48, possivelmente pelo primeiro tratamento disponibilizar maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória (Martins et al., 2005). Com essa hipótese, a outra alteração no protocolo P36 foi proposta. Observou-se que tanto na raça Holandesa (Martins et al., 2005) quanto na Angus (Chesta et al., 2007) o protocolo P36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), foi aplicado 60 horas (P36/LH60), ao invés de 48 horas (P36/LH48), após a administração de $\text{PGF}_2\alpha$. De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a $\text{PGF}_2\alpha$, pode ser vantajosa também para esta raça. Deve se destacar que o atraso no momento da ovulação foi benéfico para raças européias, porém o mesmo não ocorreu com a raça Nelore, onde esta modificação no protocolo P36 promoveu diminuição no número de embriões viáveis (Baruselli et al., 2006).

Foi demonstrado que durante o tratamento da SOV, os pulsos de LH diminuem logo após a primeira aplicação de FSH. Este declínio se acentua ao redor das últimas aplicações e próximo período pré-ovulatório. Isso ocorre devido ao aumento nas

concentrações circulantes de estradiol e progesterona em decorrência da alta atividade esteroidogênica das vacas superovuladas (Price et al., 1999). Como se sabe, o LH é imprescindível para o crescimento final dos folículos e para a completa maturação dos oócitos. Xu et al. (1995) caracterizaram a importância da expressão de receptores de LH nas células da granulosa em bovinos como ponto chave para a transição da dependência de FSH para LH. Uma maneira de suprir a deficiência endógena dos pulsos de LH pela administração de FSH exógeno (geralmente extrato de pituitária suína contendo FSH e baixa concentração de LH), seriam administrações freqüentes de GnRH, aumentando, assim, o número de folículos pré-ovulatórios provenientes do tratamento superestimulatório (Price et al., 1999; Melo et al., 2004).

Barcelos et al. (2007) testaram se a substituição do pFSH por eCG, no último dia do tratamento superestimulatório, aumentaria o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção de embriões. Esses autores testaram a substituição das duas últimas aplicações de pFSH por duas doses de 200 UI de eCG (total de 400 UI IM). Tanto o número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no momento da administração de pLH quanto o número de estruturas totais colhidas foram superiores ($p < 0,03$) nos animais que receberam eCG em comparação aos animais do P36 convencional. Estes dados são indicativos de que a eCG estimulou o crescimento folicular final, resultando em maior número de folículos capazes de ovular em resposta a administração exógena de LH e, conseqüentemente, aumentou o número total de estruturas recuperadas. Apesar de não ter ocorrido aumento estatisticamente significativo na média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG ($7,30 \pm 1,20$) quando comparadas as que não receberam esta gonadotrofina ($5,10 \pm 1,10$), o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo P-36/eCG (146) vs P-36 (102) evidencia a vantagem de se substituir as duas últimas doses de pFSH por eCG.

Na raça Brangus, o protocolo P-36/eCG melhorou a quantidade de embriões viáveis ($10,9 \pm 1,5$) quando comparado ao protocolo P36 ($7,1 \pm 1,4$; Reano et al., 2009). Resultados positivos também foram obtidos em trabalhos com a raça Sindi (*Bos indicus*), onde os autores verificaram que a adição de eCG no protocolo P36 aumentou o número de embriões viáveis ($5,8 \pm 1,3$ vs $2,6 \pm 0,7$; $p < 0,01$, Mattos et al., 2011).

Considerando os resultados satisfatórios obtidos pela adição da eCG ao P36, uma outra opção a este protocolo foi sugerida: essa gonadotrofina foi substituída por 2 doses de LH de 2 ou 4mg. Oliveira (2011), utilizando 4mg do LH não observou aumento no número de estruturas totais e embriões viáveis quando comparado ao grupo controle (P36). Porém, Rosa, (2010) testaram a dose de 2mg de LH em vacas Angus e observou que a substituição da eCG pelo LH (grupo P36/LH) resultou em declínio ($p < 0,05$) no número de embriões viáveis, quando comparado aos outros grupos. No entanto, a adição de LH as duas últimas doses de FSH (P-36/FSH+LH) melhorou a qualidade e aumentou a quantidade total de embriões viáveis coletados (P36 FSH+LH, 87) quando comparado ao grupo controle (P36, 43) e ao P-36/LH (13), sendo similar ao P36/eCG (67). Os resultados indicam que a eCG não pode ser substituída apenas pelo LH (2,0mg) no último dia do tratamento superestimulatório de vacas Angus e que a ação do FSH se faz necessária no último dia de SOV (P36/FSH+LH).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v 41, p.19-24, 1994.
- ALFURAIJI, M.M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J..S.M. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. **Anim Reprod Sci.**, v.33, p.99-109, 1993.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL(ACNB) site oficial, <http://www.nelore.org.br>, 2008.
- ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.
- BARCELOS, A.C.Z.; SATRAPA, R.A.; NOGUEIRA, M.F.G. Superstimulatory protocol P-36 in Bonsmara breed: use of eCG and delay on induction of ovulation with LH. **Acta Sci Vet.**, v.34, p.513, 2006.
- BARCELOS, A.C.Z.; GOUVÊA, L.M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D.S.; BARCELOS, L.N.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. **Acta Sci Vet.**, v.35, supl.3, (resumo), p.1260, 2007.
- BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arq Fac Vet UFRGS.*, v.26(Supl), p.179-189, 1998.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56:1483-1496, 2001.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer News Letter.**, v.23, p.5-9, 2005.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.L.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M.F.G. The use of knowledge on changing receptor population in the superstimulation of cattle. **Repr Fert Dev.**, v.22, p.132, 2010.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Sci Vet.**, v.31, p.244-245, 2003.

BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology.**, v.65, p.77-88, 2006.

BERGFELT, DR.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology.**, v.42, p.895-907, 1994.

BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; WILSON, J.M.; PHELPS, D.A.; DARLING, A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. **Theriogenology.**, v.35, p.1069-1082, 1991.

BÓ, G.A.; ADAMNS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim Reprod Sci.**, v.39, p.193-204, 1995.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci.**, v.78, p.307-326, 2003.

- BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.1115-1128, 1996.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175, 1978.
- BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Embryo production: alternative methods. **Mol Reprod Dev.**, v.36, p.266-270, 1993.
- BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v.49, p.1031-1037, 1998.
- CHESTA, P.; TRIBULO, L.; TRIBULO, H.; BALLA, E.; BARUSELLI, P.S.; BO, G.A. Effect of time of ovulation induction by gonadotrophin releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. **Reprod Fert Dev.**, v.19, p.307, 2007.
- COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v.13, n.4, p.670-691, 1992.
- DIELEMAN S.J.; BEVERS M.M.; VOS P.L.A.M.; DE LOOS F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, v.39, p.25-41, 1993.
- D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L.J.; WHLSH, J.; TRIGG, T.E., MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers

superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v.47, p.601-613, 1997.

DONALDSON, L.E.; WARD, D.N. LH effects on superovulation and fertilization rates, **Theriogenology**, v.27, p.225, 1987.

DONALDSON L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.31, p.138, 1989.

DONALDSON, L.E. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. **Theriogenology**, v.33, p.214, 1990.

ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL, G.E. JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v.6, p.523, 1976.

ERENO, R. L.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M.M.; BARUSELLI, P.S.; PEGORER, M.F.; BARROS C.M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.1288-1294, 2007.

ERENO, R.L. Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular. 2008. 65p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ERICKSON, G.F.; DANFORTH, D.R. Ovarian control of follicle development. *Am. J. Obs. Gynecol.*, v.172, p.736-747, 1995.

- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology.**, v.47, p.1489-505, 1997.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol Reprod.**, v.65, p.648-654, 2001.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci.**, v.82-83, p.109-126, 2004.
- GAMBINI, A.L.G., MOREIRA, M.B.P., CASTILHO, C., BARROS, C.M. Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.22, p.201-210, 1998.
- GASTAL, E.L.; GASTA, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. **Reproduction.**, v.128, p.417-422, 2004.
- GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci.**, v.82-83, p.431-446, 2004.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology.**, v.69, p.852-858, 2008.

- GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod Fertil.**, v.87, p.223-30, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v.48, p. 1187-94, 1996.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci.**, v.78, p.239-257, 2003.
- GONZALES, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology.**, v.33, p.519, 1990.
- GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Can Vet J.**,v.35, p.158-162, 1994.
- GOUGEON, A.Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocr Rev.**, v.17, p.121-155, 1996.
- GOULDING, D.; WILLIAMS, D.H.; DUFFY, P.; BOLAND M.P.; ROCHE J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology.**, v.34, p.767-778, 1990.
- GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **J Reprod Fertil.**, v.91, p.89, 1991.

HILL, B.R.; KUEHNER, L.F. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. **Theriogenology**, v.43, p.324, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE),
<http://www.ibge.gov.br>, 2009.

JAISWALL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. **Biol Reprod.**, v.71, p.1244-1251, 2004.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biol Reprod.**, v.58, p.1527-1532, 1998.

LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**, v.29, p.235, 1988.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci.**, v.70, p.3615-3626, 1992.

LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, v.43, p.270, 1995.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.601-611, 2002.

MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Sci Vet.**, v.33(supl.1), p.286, 2005 (resumo).

MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M.; MOURAO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. **Anim Reprod Sci.**, v.125, p.119-123, 2011.

McNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; FIDLER, A.E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod Fertil Suppl.**, v.54, p.3-16, 1999.

MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; MONTEIRO, F.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. **Acta Sci Vet.**, v.32, p.208, 2004.

MIHM, M; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domest Anim Endoc.**, V.23, p155-166, 2002.

MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; MATTOS, M.C.C.; LOPES J.R.; CARRIJO, L.H.D.; SARTORI, R. Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. **Acta Sci Vet.**, v.35, p. 958 (abstract), 2007.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology.**, v.19, p.55-82, 1983.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in supestimulated beef cows. **Theriogenology.**, v.57, p.1625-1634, 2002.

- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Sci Vet.**, v.31, p.509, 2003.
- NOGUEIRA, M.F.G.; FRAGNITO, P.S.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology.**, v. 67, p.655-660, 2007.
- OLIVEIRA, A.N.S. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado a administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore. 83p. 2011 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin $F_{2\alpha}$ or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology.**, v.49, p.667-681, 1998.
- PRICE, C.A.; CARRIÉRE, P.D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H.; GUILBAULT, L.A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology.**, v.51, p.37-46, 1999.
- REANO, I.; CARBALLO, D.; TRIBULO, A.; TRIBULO, P.; BALLA, E.; BO, G.A. Efecto de la adicion de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la produccion de embriones de donantes de embriones. **VIII Simposio internacional de reproduccion animal – IRAC.**, v.1, p.54, 2009.
- REE, T.O.; COLAZO, M.G.; LAMONT, A.G.; KASTELIC, J.P.; DYCK, M.K.; MAPLETOFT, R.J.; AMETAJ, B.N.; AMBROSE, D.J. The effect of porcine

luteinizing hormone in the synchronization of ovulation and corpus luteum development in nonlactating cows. **Theriogenology**, v.72, p.120-128, 2009.

ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administred multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v.42, p.917-29, 1994.

ROSA, F.S. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado a administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus. 2010, 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Farmacologia), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROWSON, L.E.A.; LAWSON, R.A.S.; MOOR, R.M.; BAKER, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. **J Reprod Fert.**, v.28, p.427-31, 1972.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, R.D.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows). **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, P.S.; ERENO, R.L.; BARROS, C.M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Reprod Fertil Suppl.**, v. 67, p.357–375, 2010.

SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci.**, v. 124, p.244–250, 2011.

- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil.**, v.83, p.663-671, 1988.
- SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.; BARROS, C.M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. **Theriogenology.**, v.77, p. 139–147, 2012.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol Reprod.**, v.39, p.308-317, 1988.
- SOUZA, A.H. Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. São Paulo, 2008, 152 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology.**, v.45, p.1091-1102, 1996.
- STROUD, B.; BÓ, G.A. Estatística mundial de 2009 Para transferência de embrionária em animais domésticos de fazenda resumo do relatório da comissão de recuperação de dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **Anais da XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.**, v.39, supl.1, p.157-163, 2011.

TURNBULL, E.; BRADEN, W.H.; MATTNER, P. E. The Pattern of Follicular Growth and Atresia in the Ovine Ovary. *J. Bioi. Sci.*, v.30, p.229-241, 1977.

VAN LEEMPUT, E.; VOS, P.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.; VAN DER WEIJDEN, G.; DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v.55, p.573-592, 2001.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq Agropec Bras.**, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol Reprod.**, v.53, p.951-957, 1995.

WANDJI, S.A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor during sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol Reprod.**, v.47, p.807-813, 1992.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod Suppl.**, v.61, p.71-90, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth : Local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci.**, v.82, p.63-74, 2004.

- WILLMOTT, N.; SAUNDERS, J.; BÓ, G.A, PALASZ, A.; PIERSON, R.A, MAPLETOFT, R.J. The effect FSH/LH ratio in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. **Theriogenology**, v.33, p.347, 1990.
- WILSON, J.M.; JONES, A.L.; MOORE, K.; LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. **Anim Reprod Sci.**, v.33, p.71-82, 1993.
- WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v.62, p.1042-1055, 2004.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P36, ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO DE eCG OU LH EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na
Theriogenology exceto a apresentação das figuras, tabelas e idioma

Eficiência do protocolo superestimulatório P36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore

Running title:

Protocolo P36 associado à aplicação de eCG ou LH.

José R. L. M. Cury, Eduardo Lucacin, Barbara Loureiro, Ronaldo L. Ereno, Ciro M. Barros^a

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil

^aAutor para correspondência: Ciro M Barros; fax: +55 14 3815-3744; e-mail: cmbarros@ibb.unesp.br

1 Resumo

2

3 O protocolo denominado P36 tem sido amplamente utilizado para induzir ovulação múltipla
4 e permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) facilitando o manejo de doadoras
5 de embriões. Estudos recentes com o P36 indicam que a substituição das duas últimas
6 doses de FSH por eCG pode melhorar a produção de embriões, possivelmente por sua
7 atividade LH. Objetiva-se com o presente trabalho comparar o protocolo P36 com o
8 tratamento superestimulatório convencional (com observação do estro) e testar, em vacas
9 da raça Nelore, a substituição da eCG pela aplicação simultânea de FSH e LH no último
10 dia de tratamento superestimulatório. Vacas Nelore (n=16) foram distribuídas
11 aleatoriamente em 4 grupos: superovulação convencional com observação de estro
12 (Controle), P36, P36/eCG e P36/FSH+LH. Os tratamentos foram feitos em modelo cross-
13 over, ou seja todos os animais passaram pelos 4 tratamentos. No grupo Controle, o
14 tratamento superestimulatório iniciou 10 dias após a observação do estro. As aplicações de
15 FSH foram feitas durante 4 dias consecutivos (133mg, IM), duas vezes ao dia em doses
16 decrecentes. Dois dias após o início do tratamento as doadoras receberam uma dose
17 luteolítica de d-cloprostenol (150µg, IM). As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas
18 após a detecção do estro. No grupo P36, em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras
19 receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g) e benzoato de estradiol (3 mg,
20 IM). O FSH (133mg, IM) foi administrado em doses decrecentes, 2 vezes ao dia durante o
21 D4 ao D7. No D6, foi aplicado d-cloprostenol (150µg, IM) e o dispositivo intravaginal foi
22 removido 36h mais tarde. No dia 8, a ovulação foi induzida com 12,5mg de pLH e os
23 animais foram inseminados artificialmente em tempo pré-determinado, sem a observação
24 de estro, 12 e 24 horas após a aplicação de pLH. As vacas do grupo P36/eCG foram
25 tratadas de forma semelhante ao P36, exceto que as duas últimas doses de FSH foram
26 substituídas por duas doses de 200UI de eCG (totalizando 400UI, IM). O protocolo do
27 P36/FSH+LH foi semelhante ao grupo P36, porém, juntamente com as duas últimas doses

de pFSH, os animais também receberam duas doses de 1,0mg de pLH (2mg, via IM). A coleta de embriões foi realizada 7 dias após a IA. Os dados foram analisados por ANOVA (Proc GLM, SAS). O tratamento P36/ FSH+LH diminuiu o número de embriões viáveis ($0,32 \pm 0,46$) quando comparado aos demais tratamentos: Controle ($1,73 \pm 0,48$), P36 ($2,07 \pm 0,48$) e P36/eCG ($1,76 \pm 0,46$). Conclui-se que o protocolo P36/FSH+LH não é indicado para induzir ovulações múltiplas em vacas da raça Nelore.

Palavras-chave: FSH, LH, eCG, transferências de embriões, superovulação, Nelore, *Bos indicus*.

1. Introdução

Os animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido a maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (*Bos taurus*). O rebanho de corte brasileiro (cerca de 205 milhões de cabeças, [1]) é composto em sua maior totalidade por animais da raça Nelore [2], criado principalmente em regime extensivo. O emprego de biotecnologias, tais como a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE), ainda é pouco empregado em animais da raça Nelore, devido a dificuldade de observação do cio (requer mão de obra treinada) aliado curta duração de estro dessas fêmeas e com alta incidência de manifestação noturna [3].

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular das fêmeas bovinas [4-6] tornou-se possível o desenvolvimento de protocolos de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, permitindo que a inseminação artificial seja realizada em tempo fixo (IATF), ou seja sem a observação de cio [7-9].

Segundo o relatório da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS, 2009), apesar da crescente produção brasileira de embriões *in vitro* (256.000),

foram produzidos 42.000 embriões *in vivo* [10], o que projeta aproximadamente 12.000 superovulações por ano realizadas na América do Sul. Esses resultados destacam o Brasil no cenário mundial de produção de embriões.

Entretanto, os resultados obtidos nos tratamentos superestimulatórios continuam sendo variáveis e imprevisíveis, devido a inconstância na resposta superovulatória, na taxa de fertilização e desenvolvimento dos embriões [11-15]. Esta variação individual a SOV foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos indicus*, [16]) quanto em vacas Holandesas (*Bos taurus*, [17]).

Dentre os tratamentos superovulatórios utilizados em raças zebuínas, destaca-se o protocolo P36 proposto por Barros & Nogueira [14] no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF_{2α} (daí a denominação P36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a administração desta gonadotrofina [18]. Consequentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do estro das doadoras.

Em fêmeas *Bos taurus* o P36 não se mostrou tão eficaz quanto em vacas *Bos indicus* [15]. Estes dados motivaram ajustes no protocolo P36, onde a administração do indutor de ovulação foi atrasada em 12 horas, tornando-o eficaz também em raças europeias [17,19].

Na tentativa de aumentar a produção de embriões, Barcelos et al. [20] testaram a possibilidade de substituir as duas últimas doses de FSH por eCG no protocolo P-36. A eCG, é uma gonadotrofina que possui atividade FSH e LH e portanto poderia estimular a maturação folicular final após a fase de desvio folicular quando ocorre a transição da dependência de FSH para LH. Os resultados positivos obtidos por Barcelos et al. [21] com o uso de eCG no protocolo P-36 na raça Nelore, foram confirmados na raça Sindi [22] e Brangus [23].

Dando continuidade ao trabalho de Barcelos, Rosa ([24], na raça Angus) e Oliveira ([25], na raça Nelore) testaram a substituição da eCG por LH, no último dia do tratamento superestimulatório. Observaram que a aplicação de apenas LH no último dia do tratamento superestimulatório, diminuía [24] ou não promovia alteração [25] na produção de embriões. No entanto, quando o LH foi administrado juntamente com as duas últimas doses de FSH em vacas Angus, (P36/FSH+LH), a produção de embriões viáveis foi comparável ao observado em doadoras tratadas com o protocolo P36/eCG. Estes resultados indicam que é possível substituir a eCG por FSH+LH, no último dia do tratamento do protocolo superestimulatório P36, na raça Angus [24].

Objetiva-se com o presente trabalho comparar o protocolo P36 com o tratamento superestimulatório convencional (com observação do estro) e testar, em vacas da raça Nelore, a substituição da eCG pela aplicação simultânea de FSH e LH no último dia de tratamento superestimulatório.

A hipótese a ser testada é que a aplicação de LH e FSH no último dia do tratamento superestimulatório, aumenta a taxa de ovulação, a qualidade e a quantidade de embriões viáveis produzidos.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda e Haras Simone, município de Moreira Sales (Latitude 24.012982 S e longitude 53.037180W), estado do Paraná, Brasil, durante o período de fevereiro de 2011 a fevereiro de 2012. Foram utilizadas vacas Nelore multíparas, puras de origem (PO; *Bos Indicus*, n=16), com faixa etária entre 4 a 9 anos, escore de condição corporal 3,0 a 4,5 (escala de 1 a 5; [26]) mantidas em regime de pasto *Brachiaria brizantha* e *Cynodon sp* com acesso irrestrito à água e sal mineralizado.

Antes de se iniciar os tratamentos, as vacas foram previamente avaliadas por exame ultrassonográfico (Tringa Linear Esaote Pie Medical transdutor transretal 3,5 a 15 MHz) para a confirmação de ciclicidade e ausência de quaisquer patologias reprodutivas. As doadoras foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: Controle, P36, P36/eCG e P36/FSH+LH. O experimento foi delineado em modelo *cross-over*, ou seja, todas as vacas receberam os quatro tratamentos. As inseminações foram feitas por apenas um inseminador, utilizando sêmen de um único touro e de uma mesma partida. Para facilitar o manejo dos animais, com relação à aplicação dos hormônios e avaliações ultrassonográficas durante os tratamentos, as vacas foram numeradas de 1-4 (os números correspondiam aos grupos que pertenciam no momento em que eram tratadas, n=4 em cada grupo).

Nas vacas do grupo controle o tratamento superestimulatório teve como referência o dia da manifestação do estro (D0). Dez dias após (D10) administrou-se, FSH (133mg, IM, Folltropin-V®, Bioniche, Ontário, Canadá), 2 vezes ao dia, em doses decrescentes (40, 30, 20 e 10% da dose total, respectivamente) durante 4 dias consecutivos. No (D12) às 7:00 h, foi administrada uma dose de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ (150µg, d-cloprostenol, IM, Prolise, Tecnopec, São Paulo, Brasil). Após o término da SOV (D13) iniciou-se a observação do estro e 12 e 24 h após a manifestação do mesmo, realizou-se a inseminação artificial. A coleta dos embriões foi realizada 7 dias após a primeira IA.

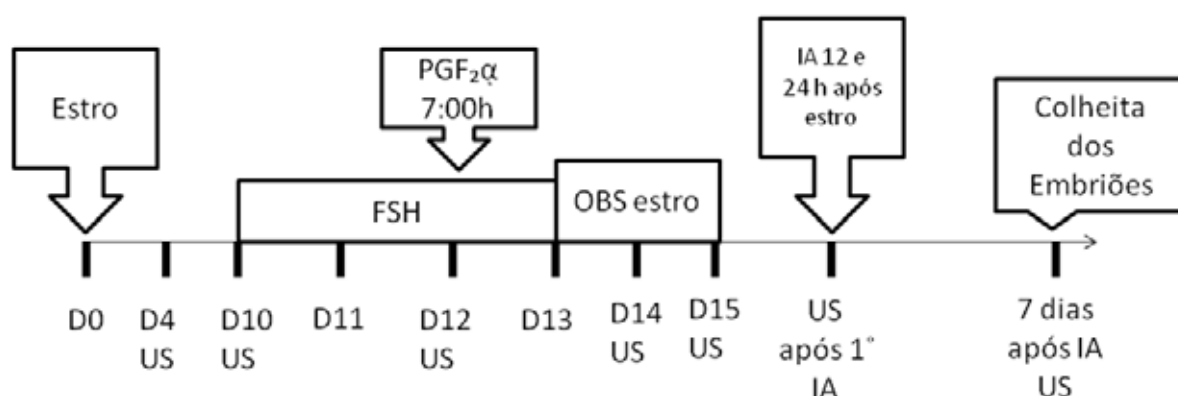


Figura 1: Tratamento superestimulatório utilizado no Grupo Controle. US = ultrassom; IA = inseminação artificial; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina.

As vacas do grupo P36, receberam em dia aleatório do ciclo estral (D0), um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (DIP, 1g, PRIMER®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) juntamente com a aplicação de 3 ml de benzoato de estradiol (BE, 3mg, IM, RIC-BE®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Quatro dias mais tarde (D4) foi iniciado o tratamento superestimulatório com pFSH (133mg, Folltropin-V®, IM), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos, em doses semelhantes as utilizadas no grupo controle. No D6 pela manhã foi administrada uma dose de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ (150 μ g, de d-cloprostenol, IM, Prolise®). Trinta e seis horas após (D7, às 19 h), o DIP foi removido. No D8 (manhã), a ovulação foi induzida pela aplicação de uma dose de LH (Lutropin®, 12,5mg, IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) e a IATF foi realizada 12 e 24 horas após.

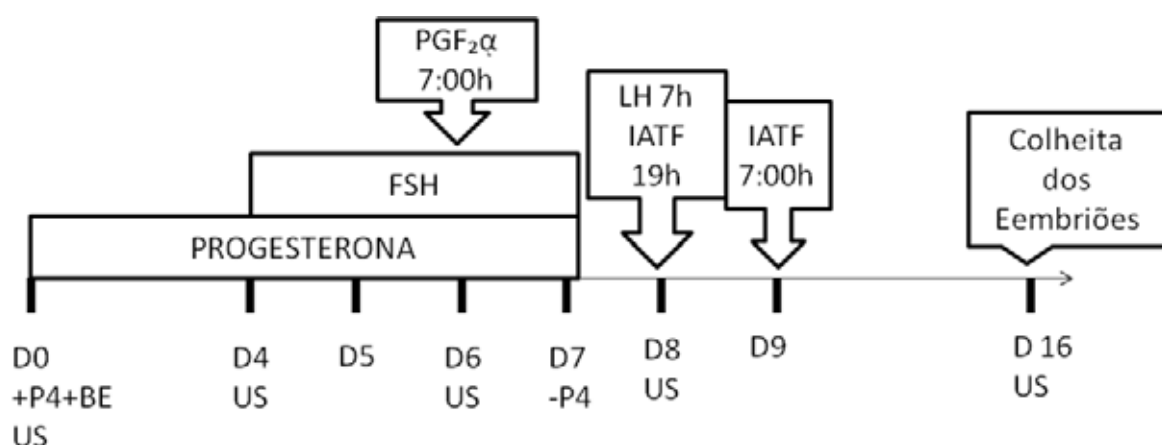


Figura 2: Tratamento superestimulatório utilizado no grupo P36. +P4 = inserção do dispositivo intravaginal; -P4 = retirada do dispositivo intravaginal; BE = benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina $F_{2\alpha}$.

O tratamento dos animais do grupo P36/eCG foi semelhante aos do grupo P36, exceto que as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses (200UI, cada) de gonadotrofina coriônica equina (eCG, totalizando 400UI, IM, Novormon®, Syntex, Buenos Aires).

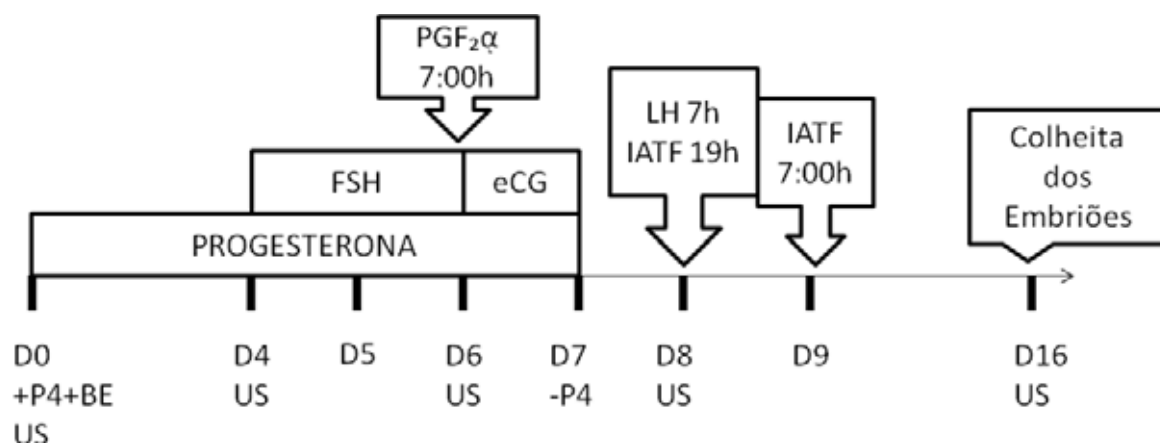


Figura 3: Tratamento superestimulatório utilizado no Grupo P36/eCG. US = ultrassom; BE = benzoato de estradiol; IATF = inseminação artificial em tempo fixo; $\text{PGF}_{2\alpha}$ = prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$; eCG = gonadotrofina coriônica equina.

No grupo P36/FSH+LH, o tratamento foi semelhante ao P36, porém, juntamente com as duas últimas doses de FSH, aplicou-se também 2 doses de 1mg cada, de LH (Lutropin®, 2mg, IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá).

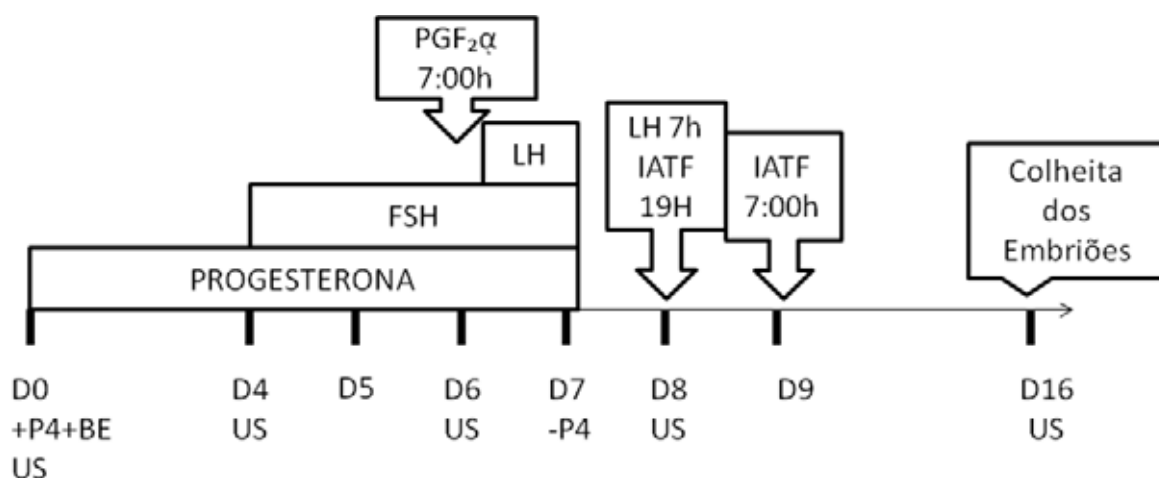


Figura 4: Tratamento superestimulatório utilizado no Grupo P36/FSH+LH. US = ultrassom; BE = benzoato de estradiol; IATF = inseminação artificial em tempo fixo; $\text{PGF}_{2\alpha}$ = prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$.

A escolha da dose 1mg de LH, administrada simultaneamente com as doses de FSH no ultimo dia do tratamento superestimulatório, foi determinada pelos resultados de um experimento preliminar, em vacas Nelore, onde as doses de 12,5; 6,25; 3,12mg de LH induziram ovulação em 80% dos animais, ao passo que as vacas que receberam 1,56 mg não ovularam [27].

2.1. Ultrassonografia

As avaliações ultrassonográfica foram realizadas nos dias indicados nas figuras, para acompanhar a dinâmica folicular (ausência de folículo dominante no início do tratamento superestimulatório para o grupo controle), eficácia dos tratamentos superestimulatórios (número total de folículos no D4, D6 e D8), taxa de ovulação e contagem de corpos lúteos (D16).

2.2. Coleta de embriões

A coleta de embriões foi feita por um mesmo veterinário, pelo método não cirúrgico, 7 dias após as inseminações, através de lavagem uterina utilizando tampão fosfato-salina (PBS). Os embriões foram avaliados e classificados como viáveis, degenerados e estruturas não fertilizadas. A classificação da viabilidade dos embriões obedeceu as normas da Manual da Sociedade internacional de Transferencia de Embriões, onde grau 1 (GI, excelente ou bom), grau 2 (GII, regular), grau 3 (GIII, pobre) e grau 4 (GIV, degenerado, [28]). Os embriões recuperados (grau I e II) foram criopreservados com etilenoglicol (Solução de Congelamento Etileno Glycol Freeze, Embriolife®).

2.3. Análise Estatística.

O quadrado mínimo das médias (LSMeans $\pm$ o erro padrão da média) da quantidade de folículos nos dias 4, 6 e 8, corpos lúteos, estruturas totais colhidas, embriões viáveis e a porcentagem de ovulação, viabilidade dos embriões, corpos lúteos/estruturas totais e embriões classificados morfológicamente como GI, GII, GIII e

degenerados foram analisados por análise de variância (ANOVA), utilizando PROC GLM do programa SAS (SAS for Windows, Version 9.2 Cary, NC). Os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno antes das análises. O efeito dos tratamentos superestimulatórios foi considerado fixo, enquanto o efeito de rodada foi considerado aleatório. Diferenças individuais entre os tratamentos foram comparadas por probabilidades de diferenças individuais (PDIFF; SAS 9.2). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

Não houve diferença entre os grupos com relação ao número total de folículos nos dias 4 e 6 ($p > 0,05$; tabela 1). Porém, o grupo Controle apresentou maior quantidade de folículos no D8, quando comparado aos animais do P36FSH+LH e não diferiu dos grupos P36 e P36/eCG ($p < 0,05$).

Tabela 1. Número de folículos (média $\pm$ EPM) nos dias 4 (início do tratamento superestimulatório), 6 (aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$) e 8 (aplicação do LH). em vacas Nelore superestimuladas dos grupos: Controle, P36, P36/eCG, P36/FSH+LH.

	Grupos Experimentais (n=16)			
	Controle	P36	P36/eCG	P36/FSH+LH
Folículos no D4	25,69 $\pm$ 2,59 ^A	27,8 $\pm$ 2,5 ^A	22,76 $\pm$ 2,4 ^A	22,86 $\pm$ 2,38 ^A
Folículos no D6	16,33 $\pm$ 1,62 ^A	15,21 $\pm$ 1,56 ^A	15,03 $\pm$ 1,5 ^A	12,88 $\pm$ 1,49 ^A
Folículos no D8	20,35 $\pm$ 1,72 ^A	16,93 $\pm$ 1,65 ^{A^B}	18,28 $\pm$ 1,59 ^{A^B}	15,57 $\pm$ 1,58 ^B

^{A, B} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)

A taxa de ovulação do grupo Controle foi inferior ao do grupo P36 (Tabela 2). No grupo P36/FSH+LH o número de estruturas totais colhidas foi inferior aos grupos Controle e P36 (Tabela 2). Em relação à proporção de estruturas viáveis, o grupo P36/FSH+LH

apresentou o menor valor em relação aos demais, conseqüentemente, a taxa de viabilidade dos embriões também foi menor no grupo P36/FSH+LH quando comparado aos demais ($p < 0,05$; tabela 2).

223

Tabela 2. Taxa de ovulação (%), número de corpos lúteos, estruturas totais colhidas, embriões viáveis, taxa de viabilidade (%) e porcentagem de estruturas totais colhidas em relação ao número de CL, em vacas Nelore superestimuladas. Os dados estão representados por média $\pm$ EPM.

	Grupos Experimentais (n=16)			
	Controle	P36	P36/eCG	P36/FSH+LH
Taxa de Ovulação (%)	30 $\pm$ 5,95 ^A	48,8 $\pm$ 5,74 ^B	36,6 $\pm$ 5,51 ^{AB}	39,34 $\pm$ 5,47 ^{AB}
Nº de Corpos lúteos	5,8 $\pm$ 1,01 ^A	7,59 $\pm$ 1,02 ^A	6,82 $\pm$ 0,98 ^A	6,03 $\pm$ 0,97 ^A
Estruturas totais	2,51 $\pm$ 0,71 ^{AB}	3,76 $\pm$ 0,71 ^A	2,51 $\pm$ 0,68 ^{AB}	1,35 $\pm$ 0,68 ^B
Embriões viáveis	1,73 $\pm$ 0,48 ^A	2,07 $\pm$ 0,48 ^A	1,76 $\pm$ 0,46 ^A	0,32 $\pm$ 0,46 ^B
Taxa de viabilidade (%)	74,72 $\pm$ 12,3 ^A	68,75 $\pm$ 10,8 ^A	63,38 $\pm$ 10,8 ^A	23,20 $\pm$ 12,45 ^B
Estruturas totais/CL (%)	45,36 $\pm$ 8,78 ^A	43,43 $\pm$ 7,9 ^A	41 $\pm$ 7,81 ^A	26,17 $\pm$ 8,42 ^A

^{A, B} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)

230

A proporção de embriões GII foi maior no grupo Controle em relação ao grupo P36/FSH+LH ($p < 0,05$) e não diferiu dos grupos P36 e P36/eCG ($p > 0,05$; tabela 3). Nenhuma diferença foi observada quanto à proporção de embriões GI e GIII entre os grupos ($p > 0,05$; tabela 3).

235

Tabela 3. Porcentagem de embriões (média $\pm$ EPM) classificados como GI, GII, GIII e embriões degenerados, de acordo com suas características morfológicas.

	Grupos Experimentais (n=16)			
	Controle	P36	P36/eCG	P36/FSH+LH
GI	43,25 $\pm$ 13,41 ^A	45,85 $\pm$ 11,83 ^A	38,88 $\pm$ 11,87 ^A	23,83 $\pm$ 13,58 ^A
II	31,33 $\pm$ 10,81 ^A	22,27 $\pm$ 9,54 ^{AB}	18,02 $\pm$ 9,57 ^{AB}	0 $\pm$ 10,94 ^B
GIII	0 $\pm$ 2,86 ^A	0 $\pm$ 2,52 ^A	6,4 $\pm$ 2,53 ^A	0 $\pm$ 2,9 ^A
Degenerado:	21,77 $\pm$ 12,29 ^A	31,02 $\pm$ 10,85 ^A	33,48 $\pm$ 10,88 ^A	76,62 $\pm$ 12,44 ^B

^{A, B} Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05)

4. Discussão

No protocolo P36/FSH+LH a resposta ao tratamento superestimulatório e a taxa de ovulação foram semelhantes às dos grupos Controle, P36 e P36/eCG. Entretanto, contrariando a hipótese inicial deste trabalho, a produção de embriões viáveis foi inferior aos demais grupos experimentais.

Este resultado surpreendente difere dos obtidos por Oliveira [25] que, ao utilizar somente LH (2 ou 4mg) em substituição as duas ultimas doses de FSH, não observou diferença na produção de embriões viáveis em relação aos protocolos P36 e P36/eCG. Por outro lado, Rosa [24] relata que houve declínio na quantidade de embriões viáveis ao tratar vacas da raça Angus com o protocolo P36/LH. No entanto, quando associou FSH com LH no último dia do tratamento superestimulatório (protocolo P36/FSH+LH), observou aumento na produção de embriões viáveis, em relação ao grupo P36/LH e produção semelhante (numericamente superior) aos grupos P36 e P36/eCG.

Os dados reportados por Rosa ([24], protocolo P36/FSH+LH), aliados aos resultados obtidos com o uso de eCG (possui atividade FSH e LH) no último dia do tratamento superestimulatório P36, em animais da raça Nelore [21], Sindi [22] e Brangus [23], indicam que talvez haja necessidade de FSH no último dia de tratamento superestimulatório, visto que os tratamentos que apresentaram aumento no número de embriões viáveis incluíam hormônio com atividade FSH (eCG ou FSH+LH).

É possível que estas aplicações de FSH, no último dia do tratamento superestimulatório, além de estimularem o crescimento de folículos pequenos que ainda não ultrapassaram a fase de desvio folicular, induzam a expressão de receptores de LH nas células da granulosa [29,30]. Desta forma, ao final do tratamento superestimulatório, a maioria dos folículos estariam aptos a ovular no momento da administração do agente indutor da ovulação (usualmente, LH ou GnRH).

A combinação de FSH com LH, no último dia do tratamento superestimulatório, se baseia no trabalho de Price et al. [31], que relataram diminuição progressiva nos pulsos de LH a partir do início de tratamento superestimulatório com FSH, devido possivelmente ao aumento nas concentrações circulantes de estradiol e progesterona, provenientes da maior atividade esteroidogênica das vacas superovuladas. Portanto, a reposição de LH no último dia do tratamento superestimulatório, justifica-se tendo em vista que o aumento da pulsatilidade do LH durante o ciclo estral é importante para o crescimento final e maturação do folículo e do oócito [32, 33, 31]. Além disso, Greve et al. [34] observaram que em animais superestimulados pode haver atraso na maturação citoplasmática do oócito, prejudicando a fertilização e, conseqüentemente, diminuindo as taxas de prenhes.

Embora o tratamento superestimulatório promova a diminuição nos pulsos de LH [31], outros estudos mostram que a administração do FSH sem a contaminação de LH promove melhora nos resultados [35,36]. Talvez esses dados possam justificar a diminuição na produção de embriões viáveis após o uso do P36/FSH+LH. Segundo

Mapletof et al. [37] o grau de contaminação do FSH com LH pode ser prejudicial quando administrado durante os protocolos de superestimulação possivelmente por induzir uma ativação precoce da meiose durante esses tratamentos [38]. No entanto, o mesmo não se observou quando somente o LH (2 ou 4mg) foi administrado no ultimo dia de tratamento da superestimulatório em vacas Nelore [25]. Esta autora observou que no protocolo onde o FSH foi totalmente substituído por LH não houve diferença no número de embriões viáveis recuperados (LH2mg, $3,7\pm0,8$ e LH4mg, $4,2\pm1,0$) quando comparado ao grupo P36/eCG ($4,5\pm0,5$).

Uma possível ação deletéria do LH poderia ser esperada também nos tratamentos superovulatórios onde a eCG foi utilizada, porém, isto não foi observado em vários trabalhos [21,24,25]. Para o protocolo P36/FSH+LH, uma possibilidade a ser considerada, é que as doses de FSH utilizadas no ultimo dia do tratamento superestimulatório (13,3mg) possuem um total de aproximadamente 2,1mg de LH contaminante, o que juntamente com a administração exógena do LH (2mg), poderia ter fornecido uma dose alta desta gonadotrofina para os animais deste experimento. No entanto, na raça Angus, quando se administrou a dose de 2mg de LH juntamente com as duas ultimas aplicações de FSH, houve tendência de aumento na quantidade de embriões viáveis [24]. Dentre as possíveis explicações para estes resultados conflitantes estão as particularidades fisiológicas que diferenciam fêmeas *Bos taurus* [32] de *Bos indicus* [39,40], principalmente em relação a taxa de crescimento folicular e tamanho em que o folículo atinge capacidade ovulatória [41,27].

Conclui-se que o protocolo P36/FSH+LH, contrariamente a hipótese inicial deste trabalho, diminui a produção de embriões viáveis e, portanto, não deve ser indicado como tratamento superestimulatório para vacas Nelore, até que experimentos adicionais confirmem ou contestem os resultados do presente trabalho.

Agradecimentos

Agradecemos a Fazenda e Haras Simone (Moreira Sales-PR) pela cessão dos animais e infraestrutura utilizada no experimento, e à FAPESP pela bolsa concedida ao José R. L. M. Cury.

5. Referências

- [1] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), <http://www.ibge.gov.br>, 2009.
- [2] Associação dos Criadores de Nelore do Brasil (ACNB) site oficial, <http://www.nelore.org.br>: 2008.
- [3] Pinheiro, OL, Barros CM, Figueiredo RA, Valle ER, Encarnação RO, Padovani CR. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin $F_{2\alpha}$ or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* 1998;49: 667-81.
- [4] Savio, J.D.; Keenan, L.; Boland, M.P.; Roche, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil* 1988;83: 663-71.
- [5] Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988;39: 308-17.
- [6] Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod. Fertil* 1989;87: 223-30.
- [7] Barros CM, Moreira MBP, Fernandes P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arq Fac Vet UFRGS* 1998;26: 179-89.
- [8] Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78: 307-26.

- 335 [9] Ereno R L, Barreiros TRR, Seneda, MM, Baruselli PS, Pegorer MF, Barros CM.
336 Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada
337 à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica
338 equina. Revista Brasileira de Zootecnia 2007;36: 1288-94.
- 339 [10] Stroud B, Bó GA. Estatística Mundial de 2009 Para Transferência de embrionária
340 em animais domésticos de fazenda resumo do relatório da comissão de
341 recuperação de dados da sociedade internacional para transferência de embriões
342 (IETS). Anais da XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de
343 Embriões 2011;39: 157-63.
- 344 [11] Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology 1993;
345 39:7-24.
- 346 [12] Boland MP, Roche JF. Embryo production: alternative methods. Mol Reprod Dev
347 1993;36: 266-70.
- 348 [13] Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for
349 synchronization and superstimulation. Theriogenology 1994;41: 19-24.
- 350 [14] Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology
351 2001;56: 1483-96.
- 352 [15] Baruselli OS, Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó
353 GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology
354 2006;65: 77-88.
- 355 [16] Baruselli, PS, Marques MO, Reis EL, Nasser LFT, Silva RCP, Menegatti JA,
356 Valentin, R, Santos ICC. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos
357 de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em
358 tempo fixo (SOTF). Acta Sci Vet 2003;31: 244-45.
- 359 [17] Martins CM, Castricini ESC, Reis EL, Torres-Júnior JRS, Gimenes LU, Sá Filho
360 MF. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de

superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. Acta Sci Vet 2005;33: 286 (abstract).

[18] Nogueira MFG, Barros CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. Acta Sci Vet 2003;31: 509.(abstract)

[19] Chesta P, Tribulo L, Tribulo H, Balla E, Baruselli PS, Bó GA. Effect of time of ovulation induction by gonadotrophin releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. Reprod Fert Dev 2007;19: 307.

[20] Barcelos ACZ, Satrapa RA, Nogueira MFG. Superstimulatory protocol P-36 in Bonsmara breed: use of eCG and delay on induction of ovulation with LH. Acta Sci Vet 2006;34: 513.(abstract)

[21] Barcelos ACZ, Gouvêa LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA, Barros CM. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. Acta Sci Vet 2007;35: 1260.(abstract)

[22] Mattos MCC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Franco MM, Mourao GB, Barros CM, Sartori R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. Anim Reprod Sci 2011;125: 119-23.

[23] Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bó GA. Efecto de la adicion de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la produccion de embriones de donantes de embriones. VIII Simposio internacional de reproduccion animal – IRAC 2009;1: 54.

[24] Rosa FS. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado a administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus. 2010, 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Farmacologia), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- [25] Oliveira ANS. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado a administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore. 83p. 2011 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- [26] Houghton PL, Lemenager RP, Hendrix KS, Moss GE, Stewart TS. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. *J Anim Sci* 1990;68: 1447–56.
- [27] Simões RAL, Satrapa RA, Rosa FS, Piagentini M, Castilho ACS, Ereno RL, Nogueira MFG, Buratini J, Barros CM. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. *Theriogenology* 2012;77: 139–47.
- [28] Stringfellow DA, Seidel SM. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões (IETS) 1998: 112-13.
- [29] Nogueira MF, Buratini J, Jr., Price CA, Castilho AC, Pinto MG, Barros CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007;74: 680-86.
- [30] Barros CM, Satrapa SA, Castilho ACS, Fontes PK, Razza EM, Ereno RL, Nogueira MFG. Influence of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development. IETS 2013. (aceito para publicação)
- [31] Price CA, Carrière PD, Gosselin N, Kohram H, Guilbault LA. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology* 1999;51: 37-46.
- [32] Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996;48: 1187-94.

- [33] Hyttel P, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47: 23-32.
- [34] Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R, Assey R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995;43: 41-50.
- [35] Looney CR, Bondioli R, Hill KG, Massey JM. Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology, *Theriogenology* 1988;29: 271.
- [36] Wilson JM, Jones AL, Moore K, Looney CR, Bondioli KR. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Anim Reprod Sci* 1993;33: 71-82.
- [37] Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 2002;42: 601-11.
- [38] Donaldson LE, Ward DN, Glenn SD. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1986;25: 747-57.
- [39] Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt RD, Ginther OJ, Barros, CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 2005;63: 2382-94.
- [40] Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008;69: 852-58.
- [41] Sartori R, Bastos, MR, Baruselli OS, Gimenes OS, Ereno RL, Barros CM. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Reprod Fertil Suppl* 2010; 67: 357–75.