

Fernanda de Souza Rosa

Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus

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

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Rosa, Fernanda de Souza.

Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus / Fernanda de Souza Rosa. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 21000000

1. Bovino - Reprodução - Aspectos farmacológicos - Estudos experimentais
2. Inseminação artificial 3. Transferência de embriões 4. Farmacologia veterinária

Palavras-chave: Bos taurus; eCG; FSH; LH; Superovulação; Transferência

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	12
CAPÍTULO 1	
RESUMO.....	14
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	20
REVISÃO DE LITERATURA	24
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2	
Resumo	44
1. Introdução.....	45
2. Material e método.....	47
2.1. Experimento 1	47
2.2. Experimento 2	51
2.3. Análise estatística.....	52
3. Resultados	53
3.1. Experimento 1	53
3.2. Experimento 2:	55
4. Discussão.....	56
5. Referências.....	59

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO...

Aos meus pais Paulinho e Ana, as minhas avós Zaidinha e Igia, a minha irmã Uly e a meu namorado Juju, por todo carinho, amor, confiança e força para que eu pudesse chegar ao fim de mais essa etapa da minha vida. Sem a presença de vocês, não seria possível!

Muito obrigada por tudo!

Vocês são minha felicidade, amo muito todos!!!!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Aos meus pais Paulinho e Ana, por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui, por estarem sempre ao meu lado e por me ensinarem a ser quem eu sou hoje. A minha irmã Uly, por ser uma amiga fiel e companheira durante todos esses anos. A minha avó Zaida, pelo amor e dedicação, e por ser meu porto seguro! E a minha avó Igia, que mesmo a distância, sempre esta presente em minha vida. Amo muito todos vocês!!!!

Ao meu namorado Juliano (Juju), pela preocupação, dedicação, carinho e amor durante os períodos decisivos de minha vida. Pela grande ajuda e apoio durante a realização dos experimentos. Te amo muito!

Ao orientador de mestrado Prof. Dr. Ciro Moraes Barros pela oportunidade em me acolher em seu laboratório. Muito obrigada! Espero ter contribuído com este imenso favor prestado. E ao Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, pelo carinho e toda atenção a mim desprendida, me ajudando com informações valiosas.

Aos amigos de pós-graduação: Rafael Satrapa, Eduardo Razza, Cíntia Fernandes, Débora Penatti, Janahi, Rafaela, Raquel Puelker, Ana Carolina Oliveira, Vinícius Pinheiro, José Renato, Ronaldo Ereno, Marcelo Pegorer, Walter Cavalcanti, Mariana Machado, Anthony Castilho, Diego Guerra, Ester Caixeta, Rúbia Bueno e aos que aqui não foram mencionados. Obrigado por todas as trocas de informações e pela amizade sincera de todos vocês.

À Ana e o Fernando Bonotto por me acolherem tão bem na fazenda Bananeiras e por todo carinho, paciência, ajuda e dedicação na realização dos experimentos. Também pela amizade que firmamos e por tudo o que me ensinaram. Aprendi muito com vocês, muito obrigada!!!!

À Prof^a. Dr^a Luzia A. Trinca pela realização da análise estatística deste trabalho. Obrigado pela paciência e disponibilidade prestada.

Aos membros da banca examinadora pela gentileza, paciência, atenção e contribuições oferecidas. E aos suplentes da banca examinadora pela disponibilidade e críticas ao presente estudo.

A todos da ABN Agropecuária pelo carinho, atenção, amizade e pela disponibilidade para realização dos experimentos. E principalmente por me acolherem tão bem entre vocês!!!!!! Muito obrigada!!!

A todos que trabalham na fazenda Bananeiras, João, Wilson, Ismar, seu Zeca, Fátima, Jéssica e Quely, pela amizade e ajuda na realização dos experimentos. A ajuda de vocês foi essencial!

A Marta por estar sempre disposta a me ajudar no que for preciso!

Aos funcionários da pós-graduação Luciene Tobias, Herivaldo Santos, Sérgio Primo Vicentini e Maria Helena Godói pela sempre grande disponibilidade e gentileza prestada no atendimento de nossas dúvidas.

Aos professores do Departamento de Farmacologia (IB) e Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ) por todos os ensinamentos, auxílios e momentos agradáveis que obtive durante esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Ana Cristina Murcia de Souza, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni por toda a amizade e bons momentos compartilhados.

A CAPES pelo auxílio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – benzoato de estradiol
CL – corpo lúteo
eCG – gonadotrofina corionica equina
FSH – hormônio folículo estimulante
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
IA – inseminação artificial
IATF – inseminação artificial em tempo fixo
LH – hormônio luteinizante
MHz - megahertz
pFSH - hormônio folículo estimulante de pituitária suína
PGF₂ α - prostaglandina F₂ α
pLH - hormônio luteinizante de pituitária suína
P4 - progesterona
SO - superovulação
TE – transferência de embriões
TETF – transferência de embriões em tempo fixo
US – ultrassom

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo controle. BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.....	49
Figura 2. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo LH60/eCG ou P-36/LH60/LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.....	50
Figura 3. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo LH60/FSH+LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.....	50
Figura 4. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo P-36/LH48/FSH+LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultra-som; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.....	52
Tabela 1. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D8 do protocolo superestimulatório, número de corpos lúteos no momento da coleta, média observada de estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e a taxa de viabilidade e o número total de embriões viáveis em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH60 (Controle), LH60/eCG (eCG), LH60/LH (LH) e LH60/FSH+LH (FSH+LH). Média±EPM.....	54
Tabela 2. Número total de embriões classificados como G I e G II (excelente e bom), G III (regular) e G IV (pobre) de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH60 (Controle), LH60/eCG (eCG), LH60/LH (LH) e LH60/FSH+LH (FSH+LH).	54
Tabela 3. Média observada do número de folículos maiores que 6 mm presentes no D8 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH (D10), número de corpos lúteos no momento da coleta de embriões, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e a taxa de viabilidade e o número total de embriões viáveis em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH48 (LH48), P36/LH48/FSH+LH (LH48/FSH+LH) e P36/LH60 (LH60). Média±EPM	55
Tabela 4. Número total de embriões classificados como G I e G II (excelente e bom), G III (regular) e G IV (pobre) de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Angus tratadas com P36/LH48 (/LH48), P36/LH48/FSH+LH (LH48/FSH+LH) e P36/LH60 (LH60).	56

CAPÍTULO 1

Resumo

Abstract

Introdução e Objetivos

Revisão de Literatura

Referências

RESUMO

O protocolo denominado P-36 tem sido amplamente utilizado para induzir ovulação múltipla, por permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e facilitar o manejo de doadoras de embriões. Estudos recentes com o P-36, mostram que a substituição das últimas duas doses de FSH por eCG melhora a produção de embriões. Entretanto, aplicações sucessivas de eCG podem induzir a formação de anticorpos e diminuir a produção de embriões bovinos. Objetiva-se com o presente trabalho verificar a eficiência do Protocolo P-36/eCG em vacas da raça Angus e testar a possibilidade de substituir a eCG pelo LH, no último dia do tratamento superestimulatório. No primeiro experimento, 22 vacas Angus foram distribuídas em 4 grupos: LH60 (controle) LH60/eCG, LH60/LH e LH60/FSH+LH. Cada doadora foi superovulada 3 vezes, de forma que um mesmo animal recebeu 3 dos 4 tratamentos, totalizando 17 vacas nos dois primeiros grupos e 16 nos demais, em um delineamento experimental de blocos incompletos. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (DIV) e benzoato de estradiol (3 mg, via IM). No grupo controle, os animais foram superestimulados com pFSH (via IM, dose total = 200 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D4 ao D7, enquanto que no grupo LH60/eCG e LH60/LH as duas últimas doses de FSH foram substituídas por eCG (totalizando 400 UI via IM) ou pLH (totalizando 2 mg, via IM), respectivamente. Finalmente, as vacas do grupo LH60/FSH+LH receberam duas doses de 1,0 mg de pLH juntamente com as duas últimas doses de pFSH. Todas as vacas foram tratadas com d-cloprostenol (150 mg, via IM) no dia 6, e o DIV foi removido 36 h após a administração da PGF2 α . No dia 8, a ovulação foi induzida com 12,5 mg de pLH (via IM,) e os animais foram IATF 12 e 24 h após a aplicação de pLH. No segundo experimento, 17 vacas foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos LH48, LH60 e LH48/FSH+LH. A diferença em relação ao experimento 1 é que nos grupos P36LH48 e LH48/FSH+LH o agente indutor da ovulação foi administrado 48 h após a administração de PGF2 α , ao invés de 60 h. Cada doadora foi superestimulada 3 vezes e recebeu todos os tratamentos (delineamento cross-over). Tanto no experimento 1, como no 2 a coleta de embriões foi realizada nos dias 15 e 16. Os dados foram analisados por meio da ANOVA (Proc Mixed do SAS). No experimento 1, a substituição de eCG por LH (grupo LH60/LH) resultou em

diminuição significativa no número de estruturas colhidas e de embriões viáveis, em relação aos demais grupos. Entretanto, a adição de LH às duas últimas doses de FSH (LH60/FSH+LH) melhorou a qualidade dos embriões e aumentou numericamente o total de embriões viáveis produzidos (87) em relação ao grupo controle (43) e grupo LH60/LH (13). No experimento 2 não se observou diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número de estruturas colhidas e embriões viáveis, porém o grupo LH48/FSH+LH apresentou maior número de embriões grau I e II que os demais grupos ($p < 0,05$). Conclui-se que o eCG pode ser substituído por FSH e LH, no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo P-36, sem haver prejuízo na produção de embriões viáveis.

Palavras-chave: FSH, LH, eCG, transferências de embriões, superovulação, Angus, *Bos taurus*.

ABSTRACT

The protocol called P-36 has been broadly used to induce multiple ovulations, due to the fact that it allows fixed-time artificial insemination (FTAI), and facilitates embryo donors handling. Recent studies with P-36 protocol, have shown that replacement of the last two doses of FSH by eCG improves embryo yield. However, after consecutive use, eCG may induce antibody and decrease bovine embryo production. The objective of the present study is to verify the efficiency of protocol P-36/eCG in Angus breed, and to test the replacement of eCG by LH in the last day of superestimatory treatment. In experiment 1, 22 Angus cows were randomly allotted to 4 groups: LH60 (Control), LH60/eCG, LH60/LH and LH60/FSH+LH. Each donor was superovulated 3 times, in such a way that each animal received 3 of 4 treatments, totaling 17 cows in the first two groups and 16 in the others (incomplete block design). At a random stage of the estrous cycle (D0), the embryo donors received an intravaginal device (IVD) containing 1.0 g of progesterone and estradiol benzoate (3.0 mg, i.m.). In the control group the animals were superstimulated with pFSH (i.m., total dose = 200 mg) twice a day in decreasing doses from D4 to 7, whereas in groups LH60/eCG and LH60/LH the last two doses of FSH were replaced by eCG (i.m., total dose = 400 IU) or LH (i.m., total dose = 2.0 mg), respectively. Finally, the cows from group LH60/FSH+LH received two doses of 1.0 mg of LH simultaneously with the last two doses of FSH. All animals were treated with d-cloprostenol (150 mg, i.m.) on day 6, and the IVD was removed 36 h after PGF2 α administration. Ovulation was induced with 12.5 mg of pLH (i.m.), on day 8, and the animals were FTAI 12 and 24 h after pLH. In experiment 2, 17 cows were randomly allocated in 3 groups: LH48, LH60 and LH48/FSH+LH. The difference between the first and the second experiment is that in groups LH48 and LH48/FSH+LH the hormone used to induce ovulation was administered 48 h after PGF2 α , instead of 60 h. Each donor was superstimulated 3 times and received all treatments (cross-over design). Embryo flushing was performed on day 15 and 16, in both experiments. The data was analyzed by ANOVA (Proc Mixed, SAS). In experiment 1, replacement of eCG by LH (group LH60/LH), resulted in a significant decline on number of structures recovered (total ova/embryos) and number of viable embryos, when compared to the other groups. However, addition of pLH to the last two doses of pFSH (LH60/FSH+LH) improved embryo quality and

numerically increased the total embryo yield (87) when compared to Control (43) and LH60/LH group(13). In experiment 2, there was no significant difference among treatments for total structures recovered and viable embryos. Nevertheless, group LH48/FSH+LH had a higher number of embryos qualities I and II than the others groups ($p<0.05$). It is concluded that eCG can be replaced by FSH and LH, in the last day of superestimulation treatment of P-36 protocol, without affecting viable embryos yield.

Keywords: FSH, LH, eCG, embryo transfer, superovulation, Angus, *Bos taurus*.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As criações de gado de corte na região sul do Brasil contam com a predominância de animais de raças européias (*Bos taurus*). Entre elas, a raça Angus se destaca devido às suas características como: rusticidade, precocidade, fertilidade, facilidade de partos, habilidade materna e, principalmente, qualidade da carne. Esse item é fundamental, uma vez que atende às exigências do mercado moderno: animais jovens e com uma camada de gordura suficiente para satisfazer o gosto do consumidor.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação – SO) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético do gado, tendo como objetivo, obter o máximo número de embriões com altas taxas de prenhez (Mapletoft e Pierson, 1993). Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas e a dificuldade de detecção de cio das doadoras ainda estão entre os maiores problemas nos programas comerciais de transferência de embriões (TE) (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) (Barros et al., 1998). De forma similar, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na transferência de embriões (Barros e Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010).

Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo denominado P-36 no qual a fonte de progesterona é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α 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 injeção de LH (Nogueira & Barros, 2003). Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore (Barros e Nogueira, 2001; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira et al. 2007). Em publicação recente, Nogueira et al. (2007) reportaram em 136 colheitas a média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36.

No entanto, a utilização do protocolo P-36 em raças européias diminui o número de embriões viáveis quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou ajustes no protocolo P-36, a fim de torná-lo eficaz, também, em raças européias. Nas raças Holandesa (Martins et al., 2005) e Angus (Chesta et al., 2007) o protocolo P-36 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 PGF2 α . 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 PGF2 α , pode ser vantajosa também para esta raça. Além disso, estes autores testaram uma outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de pFSH por uma única aplicação de eCG (200 UI) para estimular tanto o crescimento final (após a fase de divergência) quanto à maturação dos folículos ovarianos (atividade LH da eCG). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, os resultados promissores estimularam novos experimentos com a eCG na raça Nelore.

Em 2007, Barcelos et al. 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. 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. 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 às 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.

Entretanto, Baruselli et al. (2008) demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2.000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG.

Levando-se em consideração os resultados favoráveis do uso do eCG no protocolo P-36 e a possibilidade da formação de anticorpos contra esta gonadotrofina, objetivou-se com o presente trabalho verificar a eficiência do protocolo P-36/eCG em vacas da raça Angus e testar a possibilidade de se substituir a eCG pelo pLH, no último dia do tratamento superestimulatório.

Hipótese a ser testada:

A substituição do eCG pelo pLH ou adição de pLH às duas últimas doses de pFSH, no protocolo P-36, é tão eficaz quanto a utilização de eCG no último dia do tratamento superestimulatório.

REVISÃO DE LITERATURA

Dinâmica folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induz o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica de crescimento folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos, é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em vários estágios da vida reprodutiva, como no período anterior à puberdade (6 a 8 meses de idade, Adams et al., 1992; Evans et al., 1994), durante o ciclo estral, a gestação (Ginther et al., 1996b) e no pós-parto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a, b).

A dinâmica de crescimento folicular dos bovinos é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000; Sartorelli et al., 2005; Castilho et al., 2007; Gimenes et al., 2008) e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Murphy et al., 1990; Viana et al., 2000).

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).

A emergência da onda folicular, também denominada de recrutamento folicular, consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos com diâmetro aproximado de 4 a 5 mm (Ginther et al., 1996a) estimulados por um aumento transitório do FSH (Fortune, 1993). Mais recentemente, com o avanço na qualidade dos aparelhos de ultrassonografia acoplados a transdutores de 9,0 MHz, foi possível a visualização de folículos com diâmetro a partir de 1,0 mm (Jaiswal, et al., 2004; Ereno, 2008). Além disso, pode-se observar a emergência da onda folicular cerca de 12 (Ereno, 2008) ou 48 (Jaiswal, et al., 2004) horas antes da ovulação.

Aproximadamente três dias após a emergência folicular (folículos com 4 a 5 mm), quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1996a), ocorre o evento denominado desvio folicular,

momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (Ginther et al., 1996a, 1997).

Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional e de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Consequentemente, o folículo dominante sofre atresia e falha em ovular (Ginther et al., 1989; Lucy et al., 1992; Stock & Fortune, 1993).

De 17 a 20 dias após a ovulação o corpo lúteo sofre regressão morfológica e funcional causada pela liberação de $\text{PGF2}\alpha$ proveniente do endométrio (Horton & Poyser, 1975). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela queda na produção de progesterona e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, a proliferação do tecido conjuntivo, a desorganização celular, a degeneração e a fagocitose das células luteais (Milvae et al., 1996). Como resultado, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona ($<1 \text{ ng/mL}$), permitindo a ovulação do folículo dominante por meio do pico pré-ovulatório de LH.

Tratamentos para induzir ovulação múltipla

Vários tratamentos para induzir ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987; Alfuraiji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (pFSH) 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 ovulação. Essas pesquisas envolviam dose, eficiência de produtos comerciais e as variações nos índices FSH:LH de diferentes produtos comerciais (Donaldson & Ward, 1987; Donaldson, 1990). Nestes trabalhos ficou caracterizada 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. Além disso, evidenciou-se que uma resposta superovulatória melhor e mais consistente pode ser obtida com preparações contendo FSH quando comparadas com ou eCG (Donaldson & Ward, 1987).

Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1993) mostraram o efeito negativo de altas concentrações de LH sobre a produção e a qualidade de embriões bovinos, sugerindo que o nível máximo de contaminação de LH no FSH seja de aproximadamente 15 a 20%.

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 primeiro dia 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 das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

Já foi amplamente demonstrado que o uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais), associada à administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e origina uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início dos tratamentos (revisto por Bó et al., 1995, 2003). A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova 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 o dispositivo intravaginal é removido. 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, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

Foi sugerido que folículos que não ovulam, após superestimulação com FSH, não se desenvolveram normalmente ou não possuem 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 tem sido 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 a ovulação era induzida pela administração de pLH ou GnRH (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro. Entretanto, com estes tratamentos hormonais foi possível controlar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. A partir destes experimentos foi desenvolvido um novo protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001; 2005), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de progesterona (ou seja, 48 horas após a aplicação de PGF2 α). 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 injeção de pLH, evitando a inconveniência da detecção do estro.

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., 2002; Nogueira & Barros 2003). Além disso, podem ser utilizadas diversas fontes exógenas de progesterona sem que ocorram alterações na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira & Barros, 2006).

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore (Barros e Nogueira, 2001; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira et al. 2007). Em publicação recente, Nogueira et al. (2007) reportaram em 136 colheitas a média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36.

Modificações no protocolo P-36 para raças taurinas.

O protocolo P-36 apresenta bons resultados para doadoras zebuínas (*Bos indicus*; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006; Barcelos et al., 2007; Nogueira et al., 2007), entretanto, quando doadoras taurinas (*bos taurus*) são submetidas a este protocolo, o número de estruturas totais tem sido insatisfatório (Baruselli et al., 2006). Estes resultados podem ser atribuídos as particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*. Dentre elas, o diâmetro folicular, sendo que fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (8,5 mm para *Bos taurus*; Ginther et al., 1996a e 6,1 mm para *Bos indicus*; Sartorelli et al., 2005). Deste modo supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitem alcançar diâmetros maiores do que as fêmeas zebuínas.

De fato Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente folículos com diâmetro acima de 10 mm ao passo que Gimenes et al. (2008) e Simões et al. (2010) observaram que fêmeas *Bos indicus* apresentaram capacidade ovulatória com folículos de diâmetro em torno de 8 mm, sendo que, a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e expressão de receptores de LH nas células da granulosa (Simões et al., 2010). Desta forma, protocolos nos quais, a administração do indutor da ovulação (pLH) é atrasada 12 horas (P-36/LH60), talvez por disponibilizar maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, são mais efetivos em fêmeas taurinas do que o protocolo P-36/LH48 (Martins et al., 2005).

Esta hipótese motivou alterações no protocolo P-36, tanto na raça Holandesa (Martins et al., 2005) quanto na Angus (Chesta et al., 2007) o protocolo P-36 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 PGF2 α . 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 PGF2 α , pode ser vantajosa também para esta raça.

Uso do eCG

A gonadotrofina coriônica eqüina é uma glicoproteína complexa que tem atividade de FSH e LH (Murphy, 1991). No Brasil esta gonadotrofina é amplamente utilizada em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) em receptoras, com o objetivo de promover o crescimento final do folículo dominante (atividade LH da eCG) e facilitar a sincronização da ovulação no caso da IATF (Baruselli et al., 2004) ou promover a dupla ovulação e/ou aumentar o diâmetro do CL, a fim de melhorar as taxas de concepção nas receptoras de embriões (Bó et al., 2006).

A eCG também pode ser administrada isoladamente para induzir superovulação (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978). Esta gonadotrofina possui uma meia-vida longa (40 horas) e persiste por até 10 dias na circulação das fêmeas bovinas. Assim é administrada normalmente em uma única aplicação para promover a superestimulação (Dieleman et al., 1993). Enquanto que a meia vida do FSH na vaca foi estimada em 5 horas ou menos, por isso deve se administrar duas vezes ao dia, durante 4 dias, para induzir superovulação (Monniaux et al., 1983). Essa meia vida longa da eCG pode provocar uma estimulação contínua dos ovários, folículos anovulatórios, perfis endócrinos anormais e redução da qualidade embrionária (Saumande et al., 1978; Mikel-Jenson et al., 1982; Moor et al., 1984).

Martins et al. (2006) relataram que a utilização de eCG em dose única (2000 UI) para promover superestimulação em vacas Nelore, após a sincronização do início da onda folicular com progesterona e benzoato de estradiol, originou um número semelhante de embriões viáveis e congeláveis quando comparado ao grupo que recebeu 8 aplicações de FSH em doses decrescentes.

Foi demonstrado que após o tratamento superestimulatório com FSH, os pulsos de LH diminuem logo após a primeira aplicação de FSH e se acentuam ao redor das últimas aplicações e do período pré-ovulatório. Isso ocorre devido ao aumento nas concentrações de estradiol e progesterona pela 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).

Recentemente, 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. Vacas Nelore (n=20) foram divididas ao acaso em dois grupos: P-36 e P-36/eCG, e cada fêmea recebeu os dois tratamentos de forma alternada (cross-over). Os animais do grupo P-36 receberam o tratamento P-36 e no grupo P-36/eCG as duas últimas aplicações de pFSH foram substituídas por duas doses de 200 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (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. 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.

Outros estudos na raça Brangus (*Bos taurus x Bos indicus*; Reano et al., 2009) e na Sindi (*Bos indicus*; Mattos et al., 2010) também reportaram aumento na produção de embriões com a substituição de pFSH pelo eCG no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo P-36.

Entretanto, Baruselli et al. (2008) demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2.000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG. Em cabras,

já foi demonstrada a presença desses anticorpos após a utilização de eCG em protocolos de IATF, com conseqüente diminuição na fertilidade após a IA (Roy et al., 1999).

REFERÊNCIAS

ADAMS G.P., MATTERI R.L., KASTELIC J.P., KO J.C., GINTHER O.J. Association between surges of FSH and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Sci., v.94, p.177-88, 1992.

ADAMS G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. Theriogenology, v.41, p.19-24 1994.

ALFURAIJI MM, ATKINSON T, BROADBENT PJ, HUTCHINSON JSM. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. Anim Reprod Sci., v.33, p.99-109, 1993.

ARMSTRONG DT. Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology, v.39, p.7-24, 1993.

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 Scientiae Vet., v.34, p.513, 2006.

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 Scientiae Veterinariae v.35, p.1260, 2007 (resumo).

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, supl.26, p.179-89, 1998.

BARROS C.M., NOGUEIRA M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology, v.56, p.1483-1496, 2001.

BARROS C.M., NOGUEIRA M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. Embryo Transfer Newsletter, v.23, p.5-9, 2005.

BARROS CM, ERENO RL, SIMÕES RAL, FERNANDES P, BURATINI J, NOGUEIRA MFG. The use of knowledge on changing receptor population in the superstimulation of cattle. Repr. Fetr. And Dev., v.22, p.132, 2010.

BARUSELLI P.S., REIS E.L., MARQUES M.O., NASSER L.F., BÓ G.A. The use of hormonal treatment to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci., v.82-83, p.77-88, 2004.

BARUSELLI P.S., DE 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.

BARUSELLI OS, MARTINS CM, SALES JNS, FERREIRA RM. Novos avanços na superovulação de bovinos. Acta Sci. Vet., v.36(Supl. 2), p.433-448, 2008.

BELLOWS RA, STAIGMILLER RB, WILSON JM, PHELPS DA, DARLING A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*, v.35, p.1069-82, 1991.

BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v.42, p.895-907, 1994.

BO GA, ADAMNS GP, CACCIA M, MARTINEZ M, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.39, p.193-204, 1995.

BÓ GA, BARUSELLI PS, MARTINEZ MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sc.*, v.78, p.307-326, 2003.

BÓ G.A., BARUSELLI P.S., CHESTA P.M., MARTINS C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101. 2006.

BODENSTEINER KJ, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.1115-28, 1996.

BOLAND MP, CROSBY TF, GORDON I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology*, v.10, p.175, 1978.

BOLAND MP, ROCHE JF. Embryo production: alternative methods. *Mol. Reprod. Dev.*, v.36, p.266-70, 1993.

BRAILEANU GT, ALBANESE C, CARD C, CHEDRESE PJ. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, v.49, p.1031-37, 1998.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G.P., BRITO, L.F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.98, p.189-196, 2007.

CHESTA P, TRIBULO L, TRIBULO H, BALLA E, BARUSELLI PS, BO 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. and Dev.*, v.19, p.307, 2007.

DIELEMAN S.J., BEVERS M.M., GIELEN JTH. Increase of the number of ovulations in PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*, v.27, p.222, 1987.

DIELEMAN SJ, BEVERS MM. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. *Mol Reprod Dev.*, v.36(2) p.271-3, 1993.

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 LE, WARD DN, GLENN SD. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification of cattle. *Theriogenology*, v.25, p.747-57, 1986.

DONALDSON LE, WARD DN. LH effects on superovulation and fertilization rates, *Theriogenology*, v.27, p.225, 1987.

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

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

ELSDEN RP, HASLER JF, SEIDEL GE JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, v.6, p.523, 1976.

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.

EVANS, A.C.O., ADAMS, G.P., RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.*, v.103, p.463-70, 1994.

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. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, v.33, p.111–125, 1993.

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., KNOPF, 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. *Biology of Reproduction*, v.48, p. 1187-94, 1996a.

GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., MARTIN, S., WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.

GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.48, p.75-87, 1997.

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 TD, MURPHY BD, MAPLETOFT RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.*, v.35, p.158-62, 1994.

GORDON I. Controlled reproduction in cattle & buffaloes. Cambridge: CAB Internacional, p.492, 1996.

GOULDINGD, WILLIAMS DH, DUFFY P, BOLAND MP, ROCHE JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.34, p.767-78, 1990.

GUIBAULT LA, GRASSO F, LUSSIER JG, 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 BR, KUEHNER LF. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. *Theriogenology*, v.43, p.324, 1996.

HORTON EW, POYSER NL. Plasma progesterone levels in guinea-pigs actively immunized against prostaglandin F₂α, hysterectomized or treated with intra-uterine indomethacin. *J Endocrinol.*, v.67(1) p.81-8, 1975.

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.1527-32, 1998.

LOONEY CR, BONDIOLI KR. 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.3615-26, 1992.

LUSSIER JP, 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., PIERSON R.A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsl*, 1993; 11:14-24.

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 Scientiae Veterinariae*, 3(supl.1), p.286, 2005 (resumo).

MARTINS C.M., TORRES-JÚNIOR J.R.S., SOUZA A.H., BAUSELLI P.S. Efeito do momento da aplicação do LH na resposta superovulatória e na produção embrionária em vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas artificialmente em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (supl.1) p.529, 2006 (resumo).

MELO DS, FERREIRA MMG, MONTEIRO FM, NOGUEIRA MFG, TRINCA LA, BARROS CM. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. *Acta Sci, Vet.*, v.32, p., 2004.

MATTOS MCC, BASTOS MR, GUARDIEIRO MM, CARVALHO JO, MOURÃO GB, BARROS CM, SARTORI R. Improvement of embryo quality by the replacement of the last tow doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine gonadotropin in superstimulated Sindi donors. *Repr. Fert. And Dev.*, v.22, p.364, 2010.

MIKEL-JENSON A, GREVE T, MADEJ A, EDQVIST LE. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSF-PGF2 α treated cow. *Theriogenology*, v.18, p.33-34, 1982.

MILVAE RA, HINCKLEY ST, CARLSON JC. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v.45(7), p.1327-49, 1996.

MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J. Reprod. Fert.*, v.90, p.523-33, 1990.

MURPHY BD, MARTINUK SD. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews*, v.12, p.27-44, 1991.

MOOR R.M., KRUIP TH A.M., GREEN D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology*, v.21, p.103-116, 1984.

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 superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1625-1634, 2002.

NOGUEIRA MFG, BARROS CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Revista Acta Scientiae Veterinariae* 2003;31(sup.):509.

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.

PRICE C.A., CARRIÈRE 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 GA. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. VIII Simposio internacional de reproducción animal – IRAC, v.1, p.54, 2009.

ROBERSON M.S., WOLF M.W., STUMPF T.T., KITTOCK R.J., KINDER J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.*, v.45, p.997-1003, 1989.

ROBERTS AJ, GRIZZLE JM, ECHTERNKAMP SE. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, v.42, p.917-29, 1994.

ROY F., MAUREL M.C., COMBES B., VAIMAN D., CRIBIU E.P., LANTIER I., POBEL T., DELÉTANG F., COMBARNOUS Y., GUILLOU F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotrophin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biology of Reproduction*, v.60, p.805-813, 1999

ROWSON LEA, LAWSON RAS, MOOR RM, BAKER AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fert.*, v.28, p.427-31, 1972.

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

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.

SAUMANDE J, CHUPIN D, MARIANA JC, ORTAVANT R, MAULEON P. Factors affecting the viability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: *Control of reproduction in the cow*, Sreenan JM, ed. Martinus Nijhoff, p.195-224, 1978.

SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.*, v.83, p.663-71, 1988.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., HYNES, N., ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, Cambridge, v.88, p.581-591, 1990b.

SIMÕES RAL, SATRAPA RA, ROSA FS, PIAGENTINI M, CASTILHO ACS, ERENO RL, NOGUEIRA MFG, BURATINI J, BARROS CM. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. *Repr. Fetr. And Dev.*, v.22, p.270, 2010.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol. Reprod.*, v.39, p.308-17, 1988.

STOCK, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinol.*, v.132, p.1108-16, 1993.

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.

VAN LEEMPUT E, VOS P, HYTTTEL P, VAN DEN HURK R, BEVERS M, VAN DER WEIJDEN G, DIELEMAN SJ. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology*, v.55, p.573-92, 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.

WILSON JM, JONES AL, MOORE K, LOONEY CR, BONDOLI KR.
Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. Anim. Reprod. Sci., v.33, p.71-82, 1993.

CAPÍTULO 2

Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus

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 p-36, associado à
administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus**

Running title:

Protocolo P-36 associado à aplicação de eCG ou LH.

Fernanda S. Rosa¹, Ana L. M. Bonotto, Luzia A. Trinca², Marcelo F.G.
Nogueira³, Ciro M. Barros^{1a}

*Departamento de Farmacologia¹, Departamento de Biostatística², Instituto de
Biotecnologias, Campus de Botucatu, Departamento de Ciências Biológicas³,
Campus de Assis, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil*

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

Resumo

O protocolo denominado P-36 tem sido amplamente utilizado para induzir ovulação múltipla, por permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e facilitar o manejo de doadoras de embriões. Estudos recentes com o P-36 mostram que a substituição das últimas duas doses de FSH por eCG melhora a produção de embriões. Entretanto, aplicações sucessivas de eCG podem induzir a formação de anticorpos e diminuir a produção de embriões bovinos. Objetiva-se com o presente trabalho verificar a eficiência do Protocolo P-36/eCG em vacas da raça Angus e testar a possibilidade de substituir a eCG pelo pLH, no último dia do tratamento superestimulatório. No primeiro experimento, 22 vacas Angus foram distribuídas em 4 grupos: LH60 (controle) LH60/eCG, LH60/LH e LH60/FSH+LH. Cada doadora foi superovulada 3 vezes, de forma que um mesmo animal recebeu 3 dos 4 tratamentos, totalizando 17 vacas nos dois primeiros grupos e 16 nos demais, em um delineamento experimental de blocos incompletos. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (DIV) e benzoato de estradiol (3 mg, via IM). No grupo controle, os animais foram superestimulados com pFSH (via IM, dose total = 200 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D4 ao D7, enquanto que no grupo LH60/eCG e LH60/LH as duas últimas doses de FSH foram substituídas por eCG (totalizando 400 UI via IM) ou pLH (totalizando 2 mg, via IM), respectivamente. Finalmente, as vacas do grupo LH60/FSH+LH receberam duas doses de 1,0 mg de pLH juntamente com as duas últimas doses de pFSH. Todas as vacas foram tratadas com d-cloprostenol (150 mg, via IM) no dia 6, e o DIV foi removido 36 horas após a administração da PGF2 α . No dia 8, a ovulação foi induzida com 12,5 mg de pLH (via IM,) e os animais foram IATF 12 e 24 horas após a aplicação de pLH. No segundo experimento, 17 vacas foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos LH48, LH60 e LH48/FSH+LH. A diferença em relação ao experimento 1 é que nos grupos P36LH48 e LH48/FSH+LH o agente indutor da ovulação foi administrado 48 horas após a administração de PGF2 α , ao invés de 60 horas. Cada doadora foi superestimulada 3 vezes e recebeu todos os tratamentos (delineamento cross-over). Tanto no experimento 1, como no 2 a coleta de embriões foi realizada

nos dias 15 e 16. Os dados foram analisados por meio da ANOVA (Proc Mixed do SAS). No experimento 1, a substituição de eCG por LH (grupo LH60/LH) resultou em diminuição significativa no número de estruturas colhidas e de embriões viáveis, em relação aos demais grupos. Entretanto, a adição de LH às duas últimas doses de pFSH (LH60/FSH+LH) melhorou a qualidade dos embriões e aumentou numericamente o total de embriões viáveis produzidos (87) em relação ao grupo controle (43) e grupo LH60/LH (13). No experimento 2 não se observou diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número de estruturas colhidas e embriões viáveis, porém o grupo LH48/FSH+LH apresentou maior número de embriões grau I e II que os demais grupos ($p < 0,05$). Conclui-se que o eCG pode ser substituído por FSH e LH, no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo P-36, sem haver prejuízo na produção de embriões viáveis.

Palavras-chave: FSH, LH, eCG, transferências de embriões, superovulação, Angus, *Bos taurus*

1. Introdução

As criações de gado de corte na região sul do Brasil contam com a predominância de animais de raças européias (*Bos taurus*). Entre elas, a raça Angus se destaca devido às suas características como: rusticidade, precocidade, fertilidade, facilidade de partos, habilidade materna e, principalmente, qualidade da carne. Esse item é fundamental, uma vez que atende às exigências do mercado moderno: animais jovens e com uma camada de gordura suficiente para satisfazer o gosto do consumidor.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação – SO) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético do gado, tendo como objetivo, obter o máximo número de embriões com altas taxas de prenhez [20]. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas e a dificuldade de detecção de cio das doadoras ainda estão entre os maiores

problemas nos programas comerciais de transferência de embriões (TE) [1,6,10,13].

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular [16,32,35] tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) [5]. De forma similar, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na transferência de embriões [4,6,9,25].

Barros e Nogueira [6] desenvolveram um protocolo denominado P-36 no qual a fonte de progesterona é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α 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 injeção de pLH [26]. Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de pLH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore [6-7,9,24]. Em publicação recente, Nogueira et al. [24] reportaram em 136 colheitas a média de 13,3 $\pm$ 0,75 estruturas totais e 9,4 $\pm$ 0,63 embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36.

No entanto, a utilização do protocolo P-36 em raças européias diminui o número de embriões viáveis quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou ajustes no protocolo P-36, a fim de torná-lo eficaz, também, em raças européias. Nas raças Holandesa [22] e Angus [11] o protocolo P-36 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 PGF2 α . De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. [3], na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a PGF2 α , pode ser vantajosa também para esta raça. Além disso, estes autores testaram uma outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de pFSH por uma única aplicação de eCG (200 UI) para estimular tanto o crescimento final (após a fase de divergência) quanto à maturação dos

folículos ovarianos (atividade LH da eCG). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, os resultados promissores estimularam novos experimentos com a eCG na raça Nelore.

Em 2007, Barcelos et al. [2] 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. 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. 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 às 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.

Entretanto, Baruselli et al. [8] demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2.000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG.

Levando-se em consideração os resultados favoráveis do uso do eCG no protocolo P-36 e a possibilidade da formação de anticorpos contra esta gonadotrofina, objetivou-se com o presente trabalho verificar a eficiência do protocolo P-36/eCG em vacas da raça Angus e testar a possibilidade de se substituir a eCG pelo LH, no último dia do tratamento superestimulatório.

2. Material e método

2.1. Experimento 1

O experimento foi realizado na Fazenda Bananeiras no município de Maçambará, no estado do Rio Grande do Sul (latitude $29^{\circ}08'34''$ S, longitude $56^{\circ}03'54''$ E, altitude 110 m). As doadoras da raça Angus foram mantidas em pastagem de pensacola (*Paspalum notatum*), consorciada com pastagens de papuã (*Brachiaria plantaginea*) e milhã (*Digitaria sanguinalis*), recebendo sal

167 mineral e água a vontade. Durante o período de Setembro de 2008 a Janeiro
168 de 2009.

169 As vacas (n=24) foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos:
170 Controle (P36/LH60), LH60/eCG, LH60/LH e LH60/FSH+LH. Todos os animais
171 passaram por três dos quatro grupos, exceto duas doadoras. Sendo que, em
172 uma vaca, a P4 foi mantida até a IA durante a segunda rodada e na outra
173 observou-se que estava prenhe no início da terceira rodada. Sendo assim,
174 foram retiradas do experimento, totalizando dessa forma, 17 vacas nos grupos
175 Controle (P36/LH60) e LH60/eCG e 16 nos grupos LH60/LH e LH60/FSH+LH,
176 em um delineamento experimental de blocos incompletos, dividido em 3 rodadas,
177 onde cada doadora é considerada um bloco. Foram utilizados 10 touros da
178 raça Angus. Em cada uma dessas rodadas as doadoras receberam o sêmen
179 do mesmo touro e da mesma partida.

180 Em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0), as 22 vacas
181 foram avaliadas com ultrassom para verificar a condição ovariana (população
182 de folículos, presença de corpo lúteo (CL) e ocorrência de cisto folicular) e
183 receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1 g, PRIMER®,
184 Tecnopec, São Paulo, Brasil) e administração de 3 ml de benzoato de estradiol
185 (BE, 3 mg, via IM, Estrogin® ; Farmavet, São Paulo, Brasil). Quatro dias mais
186 tarde (D4) foi iniciado o tratamento superestimulatório (FSH, Folltropin-V®, via
187 IM, NIH-FSH-P1, Folltropin-V®, IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá),
188 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos (40, 30, 20 e 10% da dose total
189 respectivamente).

190 No dia seis (D6) às 7 h, foi administrada uma dose luteolítica de um
191 análogo da PGF2 α (150 mg de d-cloprostenol, via IM, Prolise®). Trinta e seis
192 horas após a aplicação de PGF2 α (D7 às 19 h), o dispositivo intravaginal
193 contendo progesterona foi removido. A indução da ovulação foi realizada
194 através da administração de LH (Lutropin®, 12,5 mg, via IM, BionicheAnimal
195 Health, Ontário, Canadá) no dia oito (D8) às 19 h, ou seja, sessenta horas após
196 a aplicação de PGF2 α . Os animais foram inseminados artificialmente em tempo
197 fixo (IATF), sem a observação de cio, 12 e 24 horas após a aplicação de LH
198 (Figura 1).

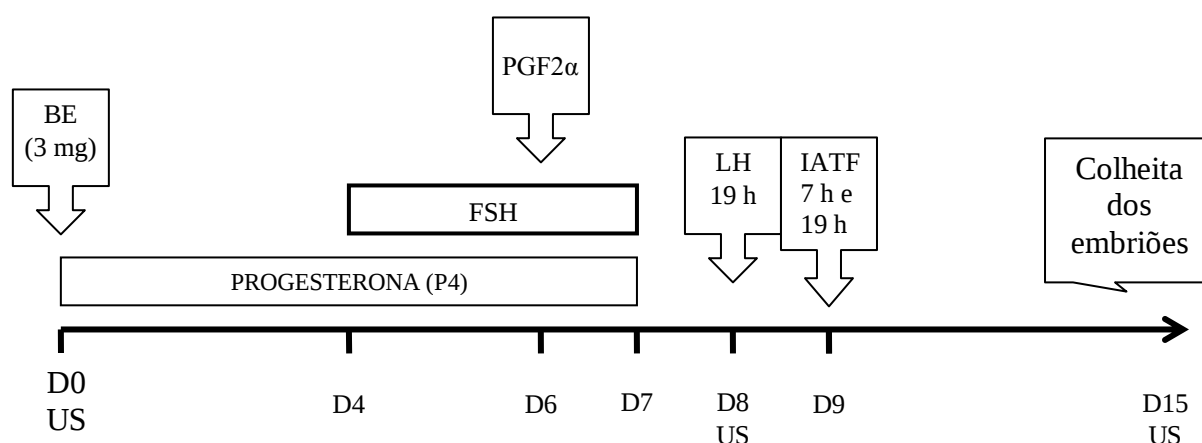


Figura 1. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo controle.

BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

Os animais do grupo LH60/eCG foram tratados de forma semelhante aos do grupo controle, porém as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, totalizando 400 UI via IM, Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Por outro lado, nas vacas de grupo LH60/LH as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas injeções de LH contendo 1,0 mg cada uma delas (dose total = 2,0 mg; Figura 2).

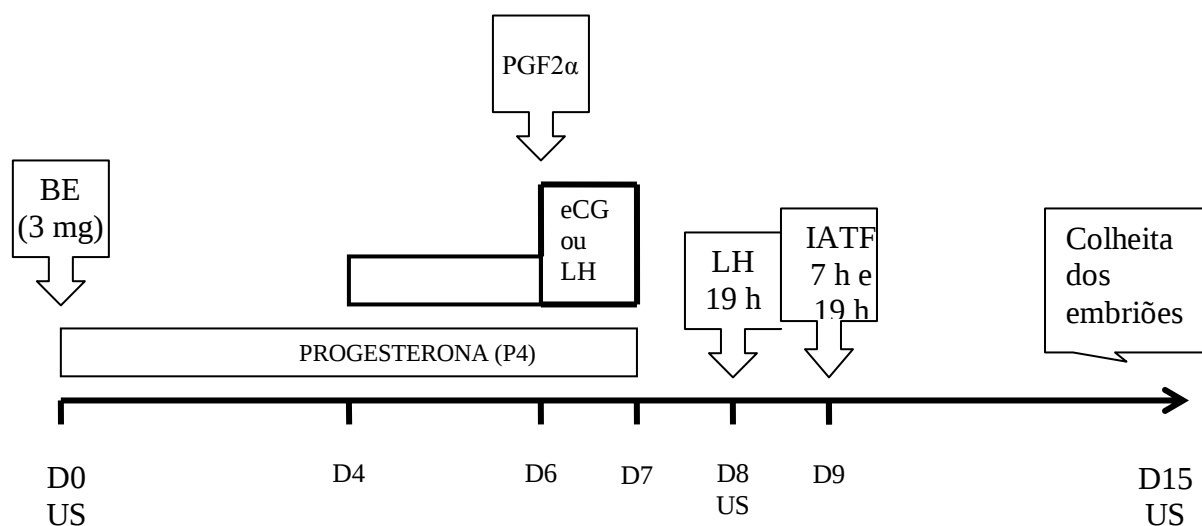


Figura 2. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo LH60/eCG ou P-36/LH60/LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

No grupo LH60/FSH+LH além das doadoras serem tratadas com FSH no dia 7, receberam também duas doses de 1,0 mg de LH (totalizando 2 mg) (Figura 3).

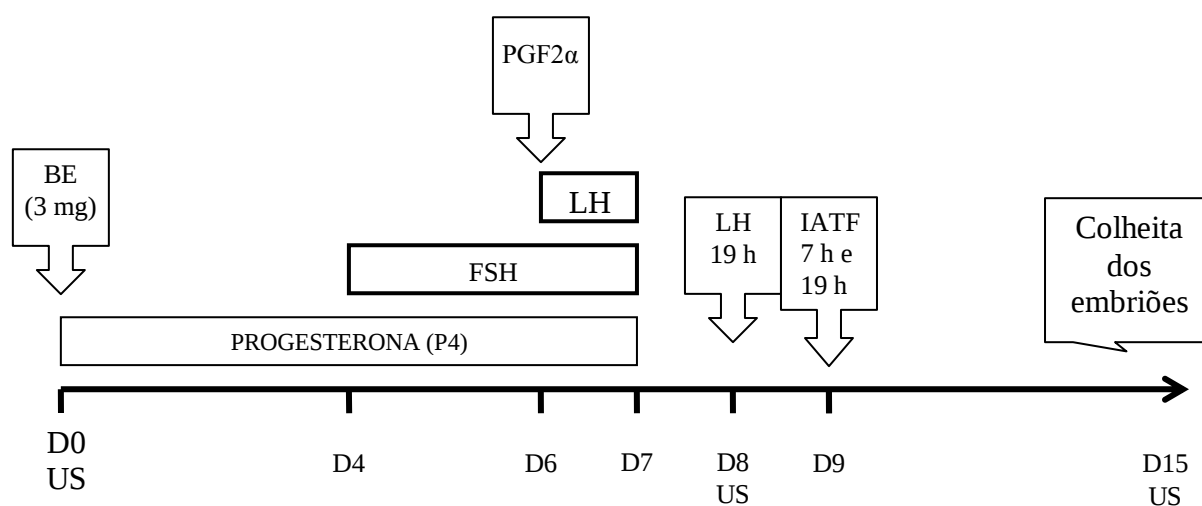


Figura 3. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo LH60/FSH+LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultrassom; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

O exame ultrassonográfico dos ovários (Mindray DP 3300-Vet., transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Mindray Bio-Medical electronics Co.Ltda, Sheuzheu, China) foi realizado nos dias indicados acima, com o objetivo de observar todos os folículos maiores que 6 mm (D8) e dos corpos lúteos presentes no ovário no momento de coleta de embriões (D15).

A coleta de embriões foi feita pelo método não cirúrgico (D 15), através de lavagem uterina com tampão fosfato-salina (PBS). Os embriões foram avaliados e classificados como viáveis, degenerados ou não fertilizados (19). Os embriões viáveis foram classificados de acordo com a qualidade em grau 1 (GI, excelente), grau 2 (GII, bom), grau 3 (GIII, regular) e grau 4 (GIV, pobre).

2.2. Experimento 2

O experimento 2 foi realizado na mesma fazenda do experimento 1, com 17 vacas da raça Angus, sendo que 9 dessas participaram também do experimento 1. Durante o mês de julho (início do experimento 2), devido à estiagem no município, as doadoras foram alimentadas com feno (*Brachiaria plantaginea* e *Digitaria sanguinalis*) e silagem de milho e do mês de agosto em diante além do feno e da silagem, as doadoras eram mantidas no período da tarde em pastagem de aveia (*Avena stigosa schreb*), recebendo sal mineral e água a vontade. O experimento foi realizado no período de julho a outubro de 2009.

As vacas foram distribuídas ao acaso em três grupos: P-36/LH60, P-36/LH48 e P-36/LH48/FSH+LH. Posteriormente, os animais foram trocados de grupo de maneira que todas as doadoras recebam os três tratamentos no final do experimento (*cross-over*).

O grupo P-36/LH60 recebeu tratamento idêntico ao descrito no grupo controle do experimento 1. No grupo P-36/LH48 os animais foram tratados de forma semelhante aos do grupo controle. Porém, o agente indutor de ovulação (LH) foi administrado 48 horas após aplicação de PGF2 α , e, no grupo P-36/LH48/FSH+LH, duas doses de LH (totalizando 2 mg) foram administradas juntamente com o FSH (Figura 4).

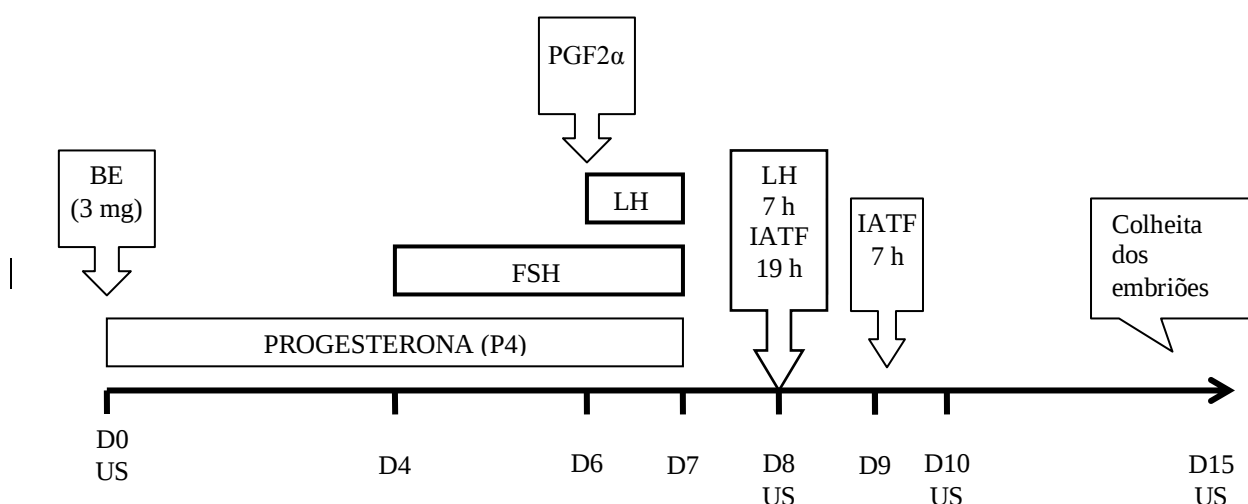


Figura 4. Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Angus do Grupo P-36/LH48/FSH+LH. BE= benzoato de estradiol; US = ultra-som; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

Além dos exames ultrassonográficos descritos no experimento 1, também foi realizado um exame no dia 10 para verificar a taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH. A coleta e a classificação morfológica dos embriões foram idênticas as descritas no experimento 1.

2.3. Análise estatística

Doadoras Angus (n=22) receberam 3 dos 4 tratamentos em um delineamento experimental de blocos incompletos, onde cada vaca foi considerada como um bloco. As variáveis, número de folículos maiores que 6 mm no dia 8, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas e não fertilizadas, embriões viáveis e número de CL no dia da coleta foram transformados em raiz quadrada e submetidos a análise de variâncias (Mixed Procedure do programa SAS), considerando o efeito da doadora como aleatório, enquanto os outros fatores (período da coleta, tratamento e interação período/tratamentos) foram considerados como efeitos fixos. Para os efeitos fixos significativos, foi usado o teste de Tuckey (*a posteriori*) para comparar pares de médias.

No experimento 2, todas as doadoras (n=17) passaram por todos os grupos (*cross-over*) e a análise estatística foi similar à do experimento 1. Além

disso, os dados de porcentagem das taxas de ovulação foram transformados em arco seno para análise de variância, considerando o efeito da doadora dentro da seqüência como aleatório e os efeitos de tratamento e período como efeitos fixos.

Para comparar cada qualidade embrionária (excelente, bom, regular e pobre) foi usado o teste de Kruskal-Wallis no experimento 1 (blocos incompletos) e Friedman no experimento 2 (cross-over). Para todas as análises, a significância foi considerada quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Não foi observado efeito da época no ano nos períodos de coleta (setembro, novembro de 2008 e janeiro de 2009). O número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no ovário no dia 8 foi semelhante entre os tratamentos, porém o número de corpos lúteos no dia da coleta foi maior no grupo LH60/FSH+LH. Já o número de estruturas colhidas, estruturas fertilizadas e embriões viáveis foram menores no grupo LH60/LH em relação aos demais (Tabela 1). Além disso, observou-se diminuição significativa dos embriões grau I e II do grupo LH60/LH em relação aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D8 do protocolo superestimulatório, número de corpos lúteos no momento da coleta, média observada de estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e a taxa de viabilidade e o número total de embriões viáveis em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH60 (Controle), LH60/eCG (eCG), LH60/LH (LH) e LH60/FSH+LH (FSH+LH). Média±EPM

	Controle (n=17)	eCG (n=17)	LH (n=16)	FSH+LH (n=16)
Folículos > 6 mm (D8)	14,59±1,20 ^a	12,94±1,13 ^a	11,75±1,13 ^a	13,75±1,22 ^a
Corpos lúteos	9,06±1,34 ^b	8,82±1,38 ^b	3,44±0,82 ^c	14,81±1,92 ^a
Estruturas totais	7,94±1,50 ^{ac}	7,06±1,24 ^{bc}	2,88±0,83 ^b	11,00±1,87 ^a
Estruturas fertilizadas	3,41±0,89 ^a	4,53±0,98 ^a	1,13±0,42 ^b	6,69±1,20 ^a
Não fertilizados	4,41±0,68 ^a	2,53±0,85 ^a	1,75±0,24 ^a	4,60±1,01 ^a
Embriões viáveis	2,53±0,67 ^a	3,94±0,85 ^a	0,81±0,23 ^b	5,44±1,01 ^a
Taxa de viabilidade	31,86	55,81	28,13	49,45
Total embriões viáveis	43	67	13	87

^{a b c} Diferença significativa entre as colunas (p<0,05)

Tabela 2. Número total de embriões classificados como G I e G II (excelente e bom), G III (regular) e G IV (pobre) de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH60 (Controle), LH60/eCG (eCG), LH60/LH (LH) e LH60/FSH+LH (FSH+LH).

Classificação	Controle	eCG	LH	FSH+LH
GI e GII	29 ^a	55 ^a	10 ^b	67 ^a
GIII	14 ^a	9 ^a	3 ^a	17 ^a
GIV	0 ^a	3 ^a	0 ^a	3 ^a

^{a b} Diferença significativa entre as colunas (p<0,05)

3.2. Experimento 2:

Os tratamentos LH48, LH48/FSH+LH e LH60 não apresentaram diferença significativa quanto ao número de folículos superiores a 6 mm no D8, taxa de ovulação, corpos lúteos no momento da coleta, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas e embriões viáveis ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média observada do número de folículos maiores que 6 mm presentes no D8 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH (D10), número de corpos lúteos no momento da coleta de embriões, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e a taxa de viabilidade e o número total de embriões viáveis em vacas Angus tratadas com os protocolos P36/LH48 (LH48), P36/LH48/FSH+LH (LH48/FSH+LH) e P36/LH60 (LH60). Média $\pm$ EPM

	LH48	LH48/LH+FSH	LH60
Folículos > 6 mm (D8)	14,41 $\pm$ 1,50	15,47 $\pm$ 1,53	15,47 $\pm$ 1,52
Taxa de ovulação (D10)	49,39	55,89	51,71
Corpos lúteos	10,24 $\pm$ 1,96	9,12 $\pm$ 1,91	9,65 $\pm$ 1,78
Estruturas totais	8,12 $\pm$ 1,84	7,71 $\pm$ 1,93	8,59 $\pm$ 1,92
Estruturas fertilizadas	3,71 $\pm$ 1,04	6,18 $\pm$ 1,52	6,12 $\pm$ 1,42
Estruturas não fertilizadas	4,12 $\pm$ 0,86	1,53 $\pm$ 0,50	2,41 $\pm$ 0,72
Embriões viáveis	2,24 $\pm$ 0,63	3,41 $\pm$ 0,93	3,59 $\pm$ 0,95
Taxa de viabilidade	27,59	44,23	41,79
Total embriões viáveis	34	57	59

Não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos

O tratamento LH48/FSH+LH originou maior número de embriões Grau I e II em relação aos demais tratamentos ($p=0,03$) e o grupo LH60 maior número de embriões Grau III ($p=0,01$) do que os outros grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Número total de embriões classificados como G I e G II (excelente e bom), G III (regular) e G IV (pobre) de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Angus tratadas com P36/LH48 (LH48), P36/LH48/FSH+LH (LH48/FSH+LH) e P36/LH60 (LH60).

Classificação	LH48	LH48/LH+FSH	LH60
GI e GII	28 ^b	46 ^a	24 ^b
GIII	4 ^b	10 ^b	32 ^a
GIV	2 ^a	1 ^a	3 ^a

^{a b} Diferença significativa entre as colunas (p<0,05)

4. Discussão

Em doadoras da raça Angus, os resultados indicam aumento numérico dos embriões viáveis nos tratamentos com eCG e com adição de LH às duas últimas doses de pFSH, quando comparados ao grupo controle. Além disso, observou-se aumento numérico dos embriões viáveis do grupo em que a indução da ovulação foi atrasada 12 horas (P36/LH60) em relação ao grupo P36/LH48.

O uso de eCG em substituição às duas últimas doses de pFSH (LH60/eCG) causou aumento numérico dos embriões viáveis em relação ao controle, corroborando trabalhos em doadoras da raça Bonsmara [3], Nelore [2], Brangus [28] e Sindi [37]. Uma das possíveis explicações para este efeito benéfico do uso de eCG é sua atividade similar à do LH [2], responsável pelo crescimento final dos folículos (após a fase de divergência; [15]) e maturação dos folículos pré-ovulatórios [12,18].

Por outro lado, Baruselli et al. [8] demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG. Em cabras, já foi demonstrada a presença desses anticorpos após a utilização de eCG em protocolos de IATF, com conseqüente diminuição na fertilidade após a IA [30].

A fim de evitar uma possível formação de anticorpos contra eCG, no presente trabalho administrou-se pLH junto com as duas últimas doses de pFSH (LH60/FSH+LH) e observou-se aumento significativo na quantidade de CL ($p<0,01$) em comparação aos demais tratamentos, e o aumento de estruturas totais quando comparado aos tratamentos com eCG ($p=0,02$) ou somente pLH ($p<0,001$). Entretanto, houve apenas aumento numérico nos embriões viáveis do grupo LH60/FSH+LH (87) quando comparado aos tratamentos LH60/eCG (67) e Controle (43; Experimento 1).

Price et al. [27] observaram que durante o tratamento superestimulatório ocorre uma diminuição dos pulsos de LH, os quais são imprescindíveis para o crescimento final dos folículos e para a completa maturação dos oócitos. O ponto chave para a transição da dependência de FSH para LH após o desvio folicular é a expressão de receptores de LH nas células da granulosa em bovinos [36]. Assim, a substituição das duas últimas doses de pFSH por pLH ou a adição de pLH às duas últimas doses de pFSH estaria fornecendo a concentração necessária de LH.

Entretanto, quando as duas últimas doses de pFSH foram substituídas por pLH (LH60/LH), observou-se, um menor número de CL, de estruturas totais, de estruturas fertilizadas, de embriões viáveis e de embriões grau I e II em relação aos demais tratamentos. Este resultado inesperado talvez possa ser explicado pela baixa dose de pLH utilizada. Considerando que o Folltropin-V possui 16% de contaminação de pLH [21], as duas últimas doses de pFSH no presente trabalho teriam aproximadamente 3,2 mg de contaminação de pLH. Quando as duas últimas doses de pFSH foram substituídas por pLH, foi administrado apenas 2 mg de pLH, enquanto nos animais em que o pLH foi administrado juntamente com as duas últimas doses de pFSH, a dose total de pLH fornecida foi ao redor de 5 mg.

Por outro lado, em experimento recente com vacas Nelore tratadas com o protocolo P-36, no qual as duas últimas doses de pFSH foram substituídas por 4 mg de pLH, não se observou aumento no número de estruturas totais (6,8 vs 8,1) e embriões viáveis (3,4 vs 3,6) em relação ao grupo controle (P-36; Oliveira et al., dados não publicados).

Dentre as possíveis explicações para estes resultados, estaria a necessidade de uma pequena quantidade de pFSH no último dia do tratamento

superestimulatório, visto que os tratamentos que apresentaram aumento numérico dos embriões viáveis incluíam hormônios com atividade FSH (eCG ou FSH+LH). Pode ser que esta atividade FSH estimule o crescimento dos folículos que ainda não atingiram o desvio, de modo a tornarem-se responsivos ao LH administrado no D8.

Existe ainda, a possibilidade do FSH favorecer o aumento na expressão de receptores de LH nas células da granulosa, como indicam os resultados obtidos *in vitro* por Nogueira et al. [23]. Estes autores observaram células da granulosa de zebuínos (*Bos indicus*) cultivadas *in vitro* na presença de FSH, apresentam aumento na expressão de algumas isoformas de LHR.

O atraso de 12 horas na aplicação do indutor da ovulação (P36/LH60) promoveu aumento numérico nos embriões viáveis em relação ao grupo P36, corroborando estudos realizados em animais de raças européias, nos quais se observou aumento significativo no número de embriões viáveis em vacas tratadas com o protocolo P-36/LH60 vs P-36/LH48 [11,22]. Estes resultados podem ser explicados pela diferença de diâmetro para adquirir capacidade ovulatória entre as fêmeas taurinas (folículos acima de 10 mm; [31] e zebuínas (folículos acima de 8 mm; [14,33]), sendo que, a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e expressão de receptores de LH nas células da granulosa [33].

No grupo em que foi adicionando pLH às duas últimas doses de pFSH (LH48/FSH+LH) apresentou apenas aumento numérico dos embriões viáveis, quando comparados aos do grupo P-36/LH48. Além disso, houve aumento significativo no número de embriões grau I e II ($p=0,03$) no tratamento LH48/FSH+LH em relação aos demais grupos. Por outro lado, no experimento 1, foi observado aumento numérico, dos embriões grau I e II do grupo LH60/FSH+LH, quando comparado aos demais tratamentos.

Este fato pode ser explicado pela necessidade de LH durante a maturação oocitária, uma vez que a competência e maturação meiótica dos oócitos são desencadeadas pelo LH, assim como a maturação citoplasmática [34]. Além disso, Greve et al. [17], observaram que em animais superestimulados pode haver atraso na maturação citoplasmática do oócito, prejudicando fertilização e, conseqüentemente, diminuindo as taxas de prenhez.

No experimento 2, a taxa de ovulação após a administração de 12,5 mg de LH foi menor que a relatada por Nogueira e Barros [26] em doadoras da raça Nelore (80%). É possível que doadoras da raça Angus necessitem uma dose maior de pLH para induzir a ovulação, ou seja, 25 mg de pLH. Recentemente, Ree et al. [29] observaram em animais *Bos taurus*, a diminuição nas taxas de ovulação (32, 58 e 84%) proporcional a dose de LH utilizada (8, 12,5 e 25 mg, respectivamente), indicando a necessidade do emprego de doses mais elevadas de pLH nas raças européias (25 mg) em comparação com as preconizadas na raça Nelore (12,5 mg).

Entretanto, é possível que no último dia do tratamento superestimulatório, a utilização de hormônios com atividade LH associados ao atraso na aplicação do indutor da ovulação (P-36/LH60) favoreça o crescimento folicular e a aquisição de receptores de LH suficientes para induzir a ovulação de cerca de 80% dos folículos, como observado no grupo LH60/FSH+LH do experimento 1 (Tabela 1).

Em resumo, no protocolo P-36/LH60, a substituição do eCG (400 UI) pelo pLH (2,0mg) no último dia do tratamento superestimulatório, resultou em diminuição significativa na produção de embriões viáveis. Entretanto, a adição de pLH às duas últimas doses de pFSH (P-36/FSH+LH) melhorou a qualidade dos embriões e aumentou numericamente o total de embriões viáveis produzidos em relação ao grupo controle (P-36). Portanto, na raça Angus, o eCG pode ser substituído pelo pFSH e pLH, no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo P-36, sem afetar a produção de embriões viáveis.

Agradecimentos:

A CAPES pelo auxílio financeiro e a ABN Agropecuária por disponibilizar os animais para a realização do experimento.

5. Referências

1. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993;39: 7-24.

- 489 2. Barcelos ACZ, Gouvêa LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN,
490 Trinca LA, Barros CM. Efeito benéfico da substituição das duas últimas
491 doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas
492 Nelore. *Acta Sci Vet*, 2007; 35:1260 (abstract).
- 493 3. Barcelos ACZ, Satrapa, R.A., Nogueira, M.F.G. Superstimulatory
494 protocol P-36 in Bonsmara breed: use of eCG and delay on induction of
495 ovulation with LH. *Acta Sci Vet* 2006;34: 513 (abstract).
- 496 4. Barros CM, Ereno, R.L., Simões, R.A.L., Fernandes, P., Buratini, J.,
497 Nogueira, M.F.G. The use of knowledge on changing receptor population
498 in the superstimulation of cattle. *reprod Fertil Dev* 2010;22: 132-137.
- 499 5. Barros, C.M., Moreira, M.B.P., Fernandes, P. Manipulação farmacologica
500 do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de
501 transferência de embriões. *Arq Fac Vet, UFRGS* 1998;26: 179-189.
- 502 6. Barros CM, Nogueira MF. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle.
503 *Theriogenology* 2001;56: 1483-1496.
- 504 7. Barros CM, Nogueira MFG. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36.
505 *Emb Trans Newsl* 2005;23: 5-9.
- 506 8. Baruselli, P.S., Sales, J.N.S., Fereira, R.M. Novos avanços na
507 superovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2008;36: 433-
508 448.
- 509 9. Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF,
510 Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus*
511 cattle. *Theriogenology* 2006;65: 77-88.
- 512 10. Boland MPR, J.F. Embryo production: alternative methods. *Mol Repr*
513 *Dev* 1993;36: 266-270.
- 514 11. Chesta P, Tribulo L, Tribulo H, Balla E, Baruselli P, Bó G. Effect of time
515 of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary
516 luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef
517 cows inseminated at a fixed time. *Repr, Fert and Dev*, 2007;307
518 (abstract).
- 519 12. Dieleman SJ, Hendriksen, P.J.M., Viuff, D., Thomsen, P.D., Hyttel. P.,
520 Knijn, H.M., Wrenzyckic, Kruip, T.A.M., Niemann H., Gadella, B.M.,
521 Bevers, M.M., Vos P.L.A.M. Effects of in vivo prematuration and in vivo

- 522 final maturation on developmental capacity and quality of pre-
 523 implantation embryos. *Theriogenology* 2002;57: 5-22.
- 524 13. Adams, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle:
 525 implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*
 526 1994;41: 19-24.
- 527 14. Gimenes, L.U., Sa Filho, M. F., Carvalho, N. A., Torres-Junior, J. R.,
 528 Souza, A. H., *et al.* Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos*
 529 *indicus* heifers. *Theriogenology* 2008;69:852–858.
- 530 15. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection
 531 in monovular species. *Biol of Repr* 2001;65: 638-647.
- 532 16. Ginther OJ, Knopf, I., Kastelic, J.P. Temporal associations among
 533 ovarian events in cattle during estrus cycle with tow and three follicular
 534 waves. *J Reprod Fertil* 1989;87: 223-230.
- 535 17. Greve T, Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R., Assey, R. The effects of
 536 exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle.
 537 *Theriogenology* 1995;43: 41-50.
- 538 18. Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. Oocyte growth, capacitation and final
 539 maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47: 23-32.
- 540 19. Linder, G.M., Wrigth, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation.
 541 *Theriogenology* 1983;20: 407-416.
- 542 20. Mapletoft RJ, Pierson, R.A. Factors affecting superovulation in the cow:
 543 practical considerations. *IETS Emb Trans News* 1993;11: 14-24.
- 544 21. Mapletoft RJ, Steward, K.B., Adams, G.P. Superovulation in perspective,
 545 2002:1-14 www.bionicheanimalhealth.com
- 546 22. Martins CM, Castricini, E.S.C., Reis, E.L., Torres-Júnior, J.R.S.,
 547 Gimenes, L.U., Sá Filho, M.F. Produção embrionária de vacas
 548 holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação
 549 artificial em tempo fixo. *Acta Sci Vet* 2005;33: 286.
- 550 23. Nogueira MF, Buratini J, Jr., Price CA, Castilho AC, Pinto MG, Barros
 551 CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine
 552 granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro.
 553 *Mol Reprod Dev* 2007;74: 680-686.
- 554 24. Nogueira MF, Fragnito PS, Trinca LA, Barros CM. The effect of type of
 555 vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-

- time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology* 2007;67: 655-660.
25. Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 2002;57: 1625-1634.
 26. Nogueira MFG, Barros CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Act Sci Vet* 2003;501 (abstract).
 27. Price, C.A., Gosselin, N., Kohran, H., Guilbault, L.A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology* 1999;51: 37-46.
 28. Reano I, Carballo D, Tribulo A, Tribulo P, Balla E, Bo 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 (abstract).
 29. Ree TO, Colazo MG, Lamont AG, Kastelic JP, Dyck MK, Mapletoft RJ, Ametaj BN, Ambrose DJ. The effect of porcine luteinizing hormone in the synchronization of ovulation and corpus luteum development in nonlactating cows. *Theriogenology* 2009 IN PRESS: 1-9
 30. Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Ddeletang, F., Combarous, Y., Guillou, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotrophin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Bio of Reprod* 1999;60: 805-813.
 31. Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65: 1403-1409.
 32. Savio JD, Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1988;83: 663-671.
 33. Simões, R.A.L., Rosa, F.S., Piagentini, M., Castilho, A.C.S., Ereno, R.L., Nogueira, M.F.G., Buratini, J., Barros, C.M. *Repr. Fetr. And Dev.*, v.22, p.270, 2010. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. *Reprod Fertil Dev* 2010;22: 270.

- 590 34. Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to
591 embryo quality. *Theriogenology* 2006;65: 126-136.
- 592 35. Sirois J, Fortune, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle
593 in heifers monitored by Real-time Ultrasonography. *Biol Reprod* 1988;39:
594 308-317.
- 595 36. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS.
596 Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone
597 receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first
598 follicular wave. *Biol Reprod* 1995;53: 951-957.
- 599 37. Mattos MCC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Mourão GB,
600 Barros CM, Sartori R. Improvement of embryo quality by the replacement
601 of the last tow doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine
602 gonadotropin in superstimulated Sindi donors. *Reprd. Fert. And Dev.*
603 2010;22: 364 (abstract).