

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAMIRO MARTINS BONOTTO

**EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36
COM A UTILIZAÇÃO DE DUAS ADMINISTRAÇÕES DE FSH,
EM ANIMAIS DA RAÇA ANGUS (*Bos taurus*)**

LAGES/SC

2015

RAMIRO MARTINS BONOTTO

**EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36
COM A UTILIZAÇÃO DE DUAS ADMINISTRAÇÕES DE FSH,
EM ANIMAIS DA RAÇA ANGUS (*Bos taurus*)**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro

LAGES/SC

2015

Bonotto, Ramiro Martins
Eficiência do protocolo
superestimulatório p-36 com a utilização
de duas administrações de fsh, em
animais da raça angus (Bos taurus) /
Ramiro Martins Bonotto. - Lages, 2015.
71 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Fabricio Desconsi
Mozzaquatro

Inclui bibliografia
Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2015.

1. transferência de embriões 2. coleta
de embriões 3. ácido hialurônico I.
Bonotto, Ramiro Martins. II.
Mozzaquatro, Fabricio Desconsi. III.
Universidade do Estado de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Título

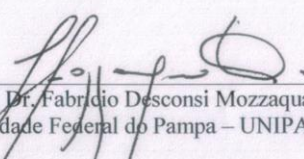
RAMIRO MARTINS BONOTTO

**EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36
COM A UTILIZAÇÃO DE DUAS ADMINISTRAÇÕES DE FSH,
EM ANIMAIS DA RAÇA ANGUS (*Bos taurus*)**

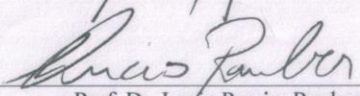
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

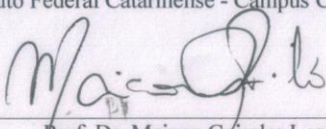
Orientador: _____


Prof. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Membro: _____


Prof. Dr. Lúcio Pereira Rauber
Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia, SC/Brasil

Membro: _____


Prof. Dr. Maicon Gaissler Lorena Pinto
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
– EPAGRI

Lages, 16/12/2015

Eu dedico este trabalho de uma forma muito especial aos meus pais, Fernando e Ana Bonotto e também a minha namorada, Fernanda Rosa, por todo o apoio durante essa etapa da minha vida. Este não é o fim de uma fase da vida, mas sim o começo de uma trajetória vitoriosa!

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao final de mais uma campereada da minha vida, gostaria de primeiramente agradecer ao Patrão Velho (DEUS), por ter me dado esta oportunidade.

A minha Namorada, Fernanda Rosa, pelo apoio, pela paciência, pelo amor, por me fazer muito feliz e também pela compreensão e ajuda durante essa etapa.

Aos meus pais Fernando e Ana, que me incentivaram e manifestaram confiança em mim durante esta jornada, obrigado por sempre apoiar meus sonhos, me dando suporte, para realizá-los.

Aos meus avós Antônio e Delir, que são à base da nossa família, o cerne, e sempre me apoiaram e me deram estímulo para continuar.

Aos meus irmãos Pedro e Guilherme, pois sempre estiveram ao meu lado, nunca “frochando” independente da peleia.

A minha madrinha Inha (Márcia), pelo apoio e pelos diversos conselhos importantíssimos e estimulantes.

A toda a minha FAMÍLIA, que sem eles não seria nada.

A ABN Agropecuária e a Fazenda Bananeira pela disponibilidade e financiamento para realização dos experimentos. Muito obrigada!!!

Ao meu orientador, Fabricio Mozzaquatro, pela confiança, paciência e oportunidade de obtenção deste título.

Agradeço a todos os docentes com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos e também pela amizade de vocês.

Ao Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem e a todos os amigos que fiz lá, que me ajudaram nessa etapa.

A Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e a PROMOP por proporcionarem a realização deste.

A todas as pessoas que de alguma forma participaram dessa fase da minha vida, que fizeram da minha passagem por Lages, um período de crescimento pessoal, técnico e profissional.

A todos, meu muito obrigado.

RESUMO

MARTINS BONOTTO, Ramiro. **Eficiência do protocolo superestimulatório P-36 com a utilização de duas administrações de FSH, em animais da raça angus (*Bos taurus*)**. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

A transferência de embriões é uma biotecnologia amplamente utilizada em vacas *Bos taurus*. Este princípio envolve a realização de um protocolo de superestimulação para indução de ovulações múltiplas. O protocolo P-36 é um dos mais utilizados com este propósito, pois permite a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) facilitando o manejo de doadoras e receptoras de embriões. A superestimulação é feita com oito doses decrescentes de pFSH a cada 12h, porém estudos mostram que a administração de pFSH com uma absorção lenta diminui o número de aplicações, mantendo a mesma produção de embriões. Assim o objetivo deste trabalho foi comparar a superovulação de vacas utilizando o protocolo P36 com redução no número de manejos. Foram utilizadas 24 vacas doadoras da raça Angus, distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Controle e MAP-5 (ácido hialurônico), em um delineamento cross over. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (DIV) e benzoato de estradiol (2 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 MAP-5 foram realizadas somente duas administrações no D4 (75% da dose) e D6 (25% da dose). As coletas de embriões foram realizadas no D15 do protocolo. A análise estatística foi realizada com o pacote estatístico SAS utilizando o procedimento Mixed com nível de significância a 5%, sendo consideradas as variáveis:

número de folículos no dia da indução de ovulação, número de corpos lúteos no momento da coleta, número de estruturas totais coletadas, número de estruturas fertilizadas e número de embriões viáveis. O grupo controle demonstrou-se significativamente melhor que o grupo MAP-5 quanto ao número de folículos ($10,08 \pm 0,61$ vs. $8,25 \pm 0,61$), corpos lúteos ($7,25 \pm 0,59$ vs. $3,25 \pm 0,59$) o que resultou em uma taxa de ovulação de 71,90% para o grupo controle e 39,39% para o grupo MAP-5. Quanto ao número de estruturas totais ($8,29 \pm 0,98$ vs. $3,08 \pm 0,98$), estruturas fertilizadas ($6,50 \pm 0,90$ vs. $2,50 \pm 0,90$) e embriões viáveis ($4,21 \pm 0,72$ vs. $2,00 \pm 0,72$) o grupo controle também demonstrou diferença significativa quando comparado ao MAP-5. O que demonstra que a redução dos manejos com a dose de 200 mg de FSH proposta como grupo MAP-5 não foi eficaz para doadoras da raça Angus.

Palavras-chave: Tranfêrencia de Embriões, Coleta de Embriões, ácido hialurônico (MAP-5), pFSH (Folltropin).

ABSTRACT

MARTINS BONOTTO, Ramiro. **Efficiency protocol superstimulatory P-36 with the use of two FSH administration in Angus cows (*Bos taurus*)**. 2015. 71f. Thesis (MS in Animal Science - Area: Animal Production) – University of the State of Santa Catarina. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2015.

Embryo transfer is a biotechnology widely used in *Bos taurus* cows. This principle involves making an over stimulation protocol for inducing multiple ovulations. The P-36 protocol is one of the most used for this purpose as it allows artificial insemination in fixed time (TAI) facilitating the management of donor and recipient embryo. The overstimulation is made with eight pFSH decreasing doses every 12 hours, but studies show that the administration pFSH with a slow absorption decreases the number of applications, maintaining output similar embryos. So the aim of this study was to compare the superovulation of cows using the P36 protocol with reduction in the number of handlings. They were used 24 donor cows of Angus, randomly assigned to two groups: Control and MAP-5 (hyaluronic acid), in a crossover design. At random stage of the estrous cycle (D0), donors received an intravaginal device containing 1.0 g progesterone (DIV) and estradiol benzoate (2 mg, IM). In the control group, the animals were over stimulated with pFSH (IM, total dose = 200 mg) twice daily in decreasing doses of D4 to D7, while the MAP-5 group were carried out only two administrations in the D4 (75% of dose) and D6 (25% of dose). The embryo collections were made in the protocol D15. Statistical analysis was performed with SAS statistical package using the Mixed procedure with 5% significance level, and the variables considered: number of follicles on the day of ovulation induction, the number of corpora lutea at collection time, total number of collected structures, structures and number of fertilized number of viable

embryos. The control group showed significantly better than the MAP-5 group and the number of follicles (10.08 ± 0.61 vs. 8.25 ± 0.61), corpora lutea (7.25 ± 0.59 vs. 3.25 ± 0.59) which resulted in a 71.90% ovulation rate for the control group and 39.39% for the MAP-5 group. As for the total number of structures (8.29 ± 0.98 vs. 3.08 ± 0.98), fertilized structures (6.50 ± 0.90 vs. 2.50 ± 0.90) and viable embryos (4.21 ± 0.72 vs. 2.00 ± 0.72) the control group also showed a significant difference when compared to MAP-5. This shows that the reduction of handlings with 200 mg of FSH proposed with MAP-5 group was not effective donor Angus breed.

Keywords: transfer of embryos, embryos collection, hyaluronic acid (MAP-5), pFSH (Folltropin).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Imagem dos ovários direito e esquerdo com presença de folículos grandes no dia da coleta da doadora AN1987 do grupo MAP-5, no experimento preliminar.....48
- Figura 2** – Esquema do protocolo de superestimulação do grupo controle em doadoras da raça Angus.....50
- Figura 3**– Esquema do protocolo de superestimulação do grupo MAP-5 em doadoras da raça Angus50
- Figura 4** – Embriões em uma placa com Holdin (meio de manutenção) após coleta do Experimento51
- Figura 5** – Imagem dos ovários direito e esquerdo no dia da aplicação do indutor de ovulação (D8) da doadora AN2415, superovulada no grupo controle.....52
- Figura 6** – Imagem dos ovários direito e esquerdo no dia da aplicação do indutor de ovulação (D8) da doadora AN3020, superovulada no grupo MAP 5.....53
- Figura 7** – Imagem dos ovários direito e esquerdo superovulados no dia da coleta de embriões (D15) da doadora AN2415, do grupo controle.....53
- Figura 8** – Imagem dos ovários direito e esquerdo superovulados no dia da coleta de embriões (D15) da doadora AN3020, do grupo MAP5.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis número de folículos (D15), número de corpos lúteos (D 15) no dia da coleta, estruturas totais, estruturas fecundadas e embriões viáveis estão expressas em valores médios.....55

Tabela 2 - Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis número de folículos (D8), número de corpos lúteos (D 15) no dia da coleta e taxa de ovulação estão expressas em valores médios com o erro padrão da média.56

Tabela 3 - Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis estruturas totais, estruturas fecundadas e embriões viáveis estão expressos em valores médios com o erro padrão da média.....57

LISTA DE SÍMBOLOS E 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

IM – intra muscular

LH – hormônio luteinizante

MAP 5 – ácido hialurônico (diluyente)

pFSH - hormônio folículo estimulante de pituitária suína

PGF2 α - prostaglandina F2 α

pLH - hormônio luteinizante de pituitária suína

P4 - progesterona

PIV – produção de embriões in vitro

SOV - superovulação

TE – transferência de embriões

TETF– transferência de embriões em tempo fixo

US – ultrassom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	35
2.1	DINÂMICA FOLICULAR.....	35
2.2	PROTOSCOLOS PARA INDUÇÃO DE OVULAÇÕES MÚLTIPLAS.....	36
2.3	SUPERESTIMULAÇÃO COM UMA ÚNICA DOSE DE FSH.....	38
2.4	GONADOTROFINA COREONICA EQUINA – eCG.....	39
2.5	HORMONIO FOLICULO ESTIMULANTE – FSH.....	39
CAPITULO 1 (ARTIGO)		
RESUMO DO ARTIGO.....		43
1	INTRODUÇÃO.....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	46
2.2	ANIMAIS.....	47
2.3	PRÉ EXPERIMENTO.....	48
2.4	EXPERIMENTO	49
2.4.1	Grupo Controle.....	49
2.4.2	Grupo MAP 5.....	50

2.5	COLETA DE EMBRIÕES.....	51
2.6	ULTRASSONOGRRAFIA.....	52
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
3	RESULTADOS.....	55
4	DISCUSSÃO.....	58
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como maior rebanho comercial de bovinos do mundo e o maior exportador de carne mundial bovina (ASBIA, 2015), o que está ligado a aplicações de técnicas modernas de produção, incluindo as biotecnologias ligadas à reprodução animal. Na região sul do Brasil predomina a criação de animais de raças europeias (*Bos taurus*) e no gado de corte destaca-se a raça Angus devido às suas características como: rusticidade, precocidade, fertilidade, facilidade de partos, habilidade materna e, principalmente, qualidade da carne. Este 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. Nos EUA a raça Angus também possui destaque devido as suas características, e desde 2007 foram criados diversos programas para a evolução genética da raça em parceria com a Associação Americana de Angus (Looney e Pryor, 2012).

Do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo é um dos principais focos da pecuária (Neves et al., 1999). A indução de ovulação múltipla (superovulação – SOV) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais utilizadas atualmente e visa acelerar o melhoramento genético do rebanho. Esta técnica tem como objetivo, obter o máximo de embriões aliado a altas taxas de prenhez (Mapletoft e Pierson, 1993). Entretanto os protocolos de SOV requerem atenção frequente por pessoas treinadas para minimizar as chances de erros na sua execução (Tríbulo et al., 2011).

Especificamente em bovinos, devido ao interesse crescente em se obter uma maior exploração do potencial genético de fêmeas para aumento da produção animal, diversas biotécnicas, tais como a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE) e a Produção de Embriões *in vitro* (PIV), têm sido desenvolvidas e aprimoradas (Renesto, 2004).

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 de bovinos, tendo como objetivo, obter o número máximo 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 (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Savio et al., 1988; Sirois e 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) bem como o controle farmacológico para tratamentos superovulatórios empregados na transferência de embriões (Barros e Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruseli et al., 2006; Barros et al., 2010).

Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo denominado P-36 que permite a realização da IA em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras. No entanto, a utilização do protocolo P-36 em raças européias não se demonstrou tão eficaz, necessitando atrasar a indução da ovulação para 24h após a retirada do dispositivo de progesterona (Martins et al., 2005; Chesta et al., 2007; Rosa, 2010).

Esta superestimulação convencional conta com 8 doses decrescentes de pFSH com intervalo de 12 horas entre as administrações, necessita de pessoal treinado, manejo adequado e mão de obra qualificada (Tribulo et al., 2011), o que pode comprometer a resposta superovulatória devido a alterações no pico pré-ovulatório de LH por estresse e condição inadequada de manejo (Bó et al., 1994; Stoebel e Moberg, 1982), pois doadoras submetidas ao estresse

apresentam um menor número de corpos lúteos no dia da coleta de embriões (Edwards et al., 1987).

Dessa forma, alguns autores vem buscando alternativas para diminuir o número de manejos. Murphy e Martinuk (1991) e Baruseli et al. (2011) testaram a utilização de eCG em dose única, reduzindo o manejo e obtendo sucesso superovulatório, porém o eCG apresenta metabolização mais lenta (meia-vida alta, ao redor de 10 dias; Dieleman et al., 1993), o que provoca uma longa superestimulação e anormalidades no perfil endócrino, reduzindo a qualidade embrionária (Mikél et al., 1982; Moor et al., 1984). Baruseli et al. (2011) demonstraram que após a terceira SOV consecutiva há um decréscimo na produção de embriões isso devendo-se, possivelmente, pela produção de anti-corpos contra eCG.

O FSH apresenta sua meia-vida ao redor de 5 horas, o que exige aplicações diárias a cada 12 horas (Laster et al., 1972; Demoustier et al., 1988). Uma alternativa para isso seria prolongar a meia-vida do FSH. Nesse intuito, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos visando a SOV com administração subcutânea de pFSH em dose única (Bó et al., 1994). Esta via possibilitaria uma liberação mais lenta de FSH quando comparado à via intramuscular. Os resultados de Bó (1994) demonstraram semelhança entre os dois métodos. De forma que, quando se fraciona a administração subcutânea de pFSH em 75% no início da SOV e os 25% restantes no dia da administração de prostaglandina, obteve-se resultados comparados aos do grupo controle (SOV convencional), porém com diminuição numérica dos embriões transferíveis (Lovie et al., 1994).

Outra alternativa para reduzir o número de manejos na aplicação de FSH, seria a diluição em meios que retardem a sua absorção e aumentem a sua meia-vida. Assim vários trabalhos nesta linha estão sendo desenvolvidos visando adequar o meio diluente ao protocolo superovulatório. Tribulo et al., (2011), utilizando ácido hialurônico e Kimura et al., (2007), utilizando hidróxido de alumínio, obtiveram resultados semelhante entre grupos tratado e controle. Bó e

Mapletoft (2014), utilizando diluente a base de ácido hialurônico, verificaram que a resposta superestimulatória era melhor quando se utilizava um esquema de doses decrescentes (2 doses na proporção 70/30). Embora alguns trabalhos tenham mostrado a possibilidade da redução do número de manejos em protocolos SOV ainda existem muitas perguntas a serem respondidas, pois os resultados ainda são muito variáveis.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar e comparar a resposta de protocolos SOV convencional (8 aplicações) com protocolo SOV (200 mg de FSH diluído em ácido Hialurônico/2 aplicações) na obtenção de embriões viáveis. Verificar se o protocolo superovulatório utilizando MAP-5 como diluente, com apenas 2 administrações, apresenta taxas de produção embrionária e resposta ovariana compatíveis ao protocolo SOV convencional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DINÂMICA FOLICULAR

As fêmeas bovinas são monovulatórias e possuem o crescimento folicular em um padrão de ondas (Lucy et al., 1992) nas quais emergem aproximadamente de 20 a 30 folículos, para que apenas um atinja a dominância (Adams, 1994). Esta dinâmica de crescimento folicular dos bovinos é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular durante um ciclo (Ginther et al., 1989; Gimenes et al., 2008) e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (Murphy et al., 1990). Boa parte dos folículos contidos nestas ondas 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 no crescimento simultâneo de um grupo de folículos com diâmetro de aproximadamente 4 a 5 mm (Ginther et al., 1996). Este crescimento é estimulado por um aumento transitório nas concentrações séricas do FSH (Fortune, 1993). A seleção folicular ocorre aproximadamente três dias após a emergência folicular quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1996). Este evento é caracterizado pela maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (Ginther et al., 1996; 1997) e é ocasionado pela diminuição na liberação de FSH pela pituitária provocado pelos próprios fatores que os folículos em crescimento produzem (Ginther et al., 1989; Adams et al., 1992).

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 e Fortune, 1993).

Em determinado momento do ciclo estral (17 a 20 dias após a ovulação), o corpo lúteo sofre regressão morfológica e funcional causada pela liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ proveniente do endométrio (Horton and 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, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (Milvae et al., 1996). Como resultado, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona (<1 ng/mL), permitindo a ovulação do folículo dominante por meio do pico ovulatório de LH.

2.2 PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DE OVULAÇÕES MÚLTIPLAS

Vários tratamentos para induzir ovulação múltipla (superovulação) já foram propostos, como o protocolo P-36 no qual a fonte de progesterona (dispositivo intravaginal de progesterona) 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 progesterona (ou seja, 48 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$) dispensando a observação de estro (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). 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 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 de crescimento 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 com o início da nova onda folicular, ou seja, 4

dias após a colocação do dispositivo intravaginal e administração de estrógeno.

O FSH é essencial para a promoção da esteroidogênese, bem como para a diferenciação das células da granulosa através da indução da expressão de receptores para LH (Demeestere et al., 2005), e também regula a comunicação entre o oócito e as células da granulosa (Albertini et al., 2001). Na OPU a superestimulação com FSH melhora a competência de desenvolvimento dos oócitos (Merton et al., 2003; Viana et al., 2015) e pode até dobrar a recuperação de oócitos viáveis (Nibart et al., 1995).

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%. Estes autores sugeriram 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).

Inicialmente o protocolo P-36 foi desenvolvido para animais da raça Nelore sendo que Nogueira et al. (2007) reportaram 136 colheitas com média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade. Porém algumas variações foram propostas por outros autores, adaptando-o a características como a raça das doadoras, indução da ovulação, aumento na dose SOV e manejos.

Em animais da raça Holandês (Martins et al., 2005) e Angus (Rosa, 2010) 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 PGF_{2α}. Assim como a substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG, também demonstraram um aumento na viabilidade dos embriões produzidos (67% vs. 43% do grupo controle; Rosa, 2010).

Os protocolos convencionais com 8 aplicações de FSH (12-12h) são amplamente difundidos e utilizados porém apresentam ampla variabilidade devido ao estresse causado pelas diversas aplicações de FSH durante todo o processo, o que necessita de pessoal treinado, manejo adequado e mão de obra qualificada (Tribulo et al., 2011).

2.3 SUPERESTIMULAÇÃO COM UMA ÚNICA DOSE DE FSH

A busca incessante na melhoria dos resultados e na obtenção de protocolos de fácil aplicação e manejo levou os pesquisadores a buscar alternativas que viabilizassem diminuir o número de aplicações de FSH nos protocolos SOV.

Alguns estudos demonstraram que o decréscimo na resposta superovulatória e alterações no pico pré-ovulatório de LH podem ser ocasionados pelo estresse e pelas condições inadequadas de manejo (Bó et al., 1994; Stoebel e Moberg, 1982). Doadoras que foram submetidas a estresses repetidos podem atrasar o pico pré-ovulatório de LH (Stoebel e Moberg, 1982) e podem demonstrar um menor número de corpos lúteos no momento da coleta (Edwards et al., 1987).

Uma alternativa para resolver este problema seria utilizar protocolos onde diminuíssem o número de manejos nos animais sem prejudicar a produção embrionária. Como a administração da eCG em dose única ou prolongar a meia-vida do pFSH através da administração subcutânea (Bó et al., 1994) ou diluir o pFSH em meios que promovam liberação lenta, como por exemplo, o ácido hialurônico (Tribulo et al., 2011) e o gel de hidróxido de alumínio (Kimura et al., 2007).

2.4 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA – eCG

A administração de uma dose única de eCG com o intuito de superestimulação, apresentou produção satisfatória de embriões, porém após a terceira SOV consecutiva há uma redução significativa no número de embriões recuperados (Baruselli et al., 2011). A utilização de eCG na reprodução é bem conhecida, pois possui 70% de atividade em receptores de FSH e 30% em receptores de LH (Murphy, 1991). Além disso, possui uma meia vida bastante longa (40h) quando comparado ao FSH que apresenta meia vida de 5 horas ou menos (Monniaux et al., 1983). Esta meia vida longa do eCG, permite então que o processo SOV seja realizado em dose única ao invés das 8 aplicações de FSH (Dieleman et al., 1993).

Baruselli et al. (2011) procuraram adequar a aplicação de eCG ao protocolo P36 e verificaram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira superovulação consecutiva em vacas com 2.000 UI de eCG. Os autores acreditam que esta diminuição na resposta superovulatória se deve a formação de anticorpos contra o eCG, já que provoca uma longa superestimulação, anormalidades no perfil endócrino e redução na qualidade embrionária (Mikél et al., 1982; Moor et al., 1984).

2.5 HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE - FSH

Devido aos transtornos ocasionados pela administração da eCG em dose única, uma outra alternativa seria prolongar a meia-vida do pFSH (Laster et al., 1972; Demoustier et al., 1988) visto que, devido sua rápida metabolização, necessita reaplicação com intervalo de 12 horas (Demoustier et al., 1988). Uma das propostas para prolongar a meia-vida do pFSH seria a administração subcutânea, que é mais lenta que a intramuscular. Bó et al., (1994), utilizaram a via subcutânea, em dose única, para superovular vacas, obtendo resultados semelhantes a SOV

convencional. De forma semelhante quando se fracionou a dose em uma administração subcutânea de 75% da dose no início do SOV e a outra de 25% juntamente com a administração de prostaglandina (2 dias após) , os resultados também foram semelhantes a SOV convencional, porém observou-se uma diminuição numérica dos embriões transferíveis (Lovie et al., 1994). Essas variações podem ser atribuídas ao metabolismo animal, que podem diminuir as concentrações de FSH circulantes (Demoustier et al., 1988).

Com o intuito de diminuir o número de aplicações de pFSH, Looney et al., (1981), pesquisaram substâncias diluentes que poderiam promover uma liberação lenta de pFSH quando da administração intramuscular. Estes pesquisadores testaram a administração intramuscular de pFSH diluído em solução de gelatina, administrado uma vez ao dia durante 4 dias do protocolo. Os resultados mostraram um maior número de corpos lúteos, porém o número de estruturas totais e fertilizadas não foi diferente do convencional. Já a administração em dose única demonstrou resultados inferiores de número de corpos lúteos e embriões viáveis (Hill et al., 1985).

Outros meios diluentes também foram testados, como o gel de hidróxido de alumínio utilizado para adsorver macromoléculas (Manhalter et al., 1985; Edelman et al., 2003). Esta associação ao pFSH administrada intramuscular em dose única, demonstrou um pico na circulação em 12 horas, e posteriormente manteve a concentração semelhante a administração convencional (12 em 12 horas) por 96 horas, resultando em um número de corpos lúteos, estruturas totais e embriões transferíveis sem diferença estatística quando compara a SOV convencional (Kimura et al., 2007).

Recentemente foi proposta a utilização do ácido hialurônico como diluente para tornar mais lenta a liberação do pFSH (Tribulo et al., 2011). O ácido hialurônico é um polímero biodegradável de dissacarídeo encontrado no útero de mamíferos, tecido conjuntivo, epitelial e neural (Bergqvist et al., 2005), que é estável e não causa

reação tecidual quando administrado em humanos e animais (Neustad et al., 2005; Kaplan et al., 2009).

Tribulo et al., (2011) verificaram que a administração de 400 mg de pFSH diluído em ácido hialurônico em dose única em doadoras Red Angus , apresentou resultados semelhantes quando comparado a SOV convencional, para o número de corpos lúteos ($13,8 \pm 1,2$ e $13,7 \pm 1,2$), estruturas totais ($13,7 \pm 2,1$ e $12,3 \pm 1,5$) e embriões transferíveis ($6,4 \pm 1,3$ e $4,9 \pm 0,8$; respectivamente) ().

Porém, em um experimento prévio comparando o grupo controle (SOV de 12 em 12 horas), grupo dose única diluído em ácido hialurônico por via IM e grupo dose única diluído em ácido hialurônico via subcutânea, Tribulo et al. (2011) observaram diferença significativa no número de corpos lúteos entre os grupos controle e intramuscular ($13,3,1 \pm 3,1$ e $11,0 \pm 2,0$) comparado ao subcutâneo ($4,2 \pm 1,0$) e entre todos os grupos quanto ao total de embriões (controle $12,7 \pm 4,0$; intramuscular $8,2 \pm 2,0$ e subcutâneo $2,0 \pm 1,4$), estruturas fertilizadas (controle $10,8 \pm 3,8$; intramuscular $5,8 \pm 1,7$ e subcutâneo $1,3 \pm 1,1$) e embriões transferíveis (controle $8,5 \pm 2,7$; intramuscular $4,7 \pm 1,6$ e subcutâneo $1,3 \pm 1,1$).

Em um estudo recente em gado de corte, Tribulo et al. (2012) comparam protocolos onde o FSH foi administrado em dose única (100%), em duas doses (75% e 25%) e controle (8 doses/12 em 12 horas). Estes autores não verificaram diferença significativa na obtenção de embriões viáveis quando comparado ao grupo controle ($6,1 \pm 1,3$; $5,0 \pm 0,9$ e $4,0 \pm 0,8$ respectivamente). Estes resultados semelhantes podem ser explicados devido ao fato da diluição do pFSH em ácido hialurônico aumentar a concentração plasmática de FSH em relação ao controle (12 em 12 horas) nas primeiras horas após o tratamento e se mantendo semelhante até as 96 horas após a administração (Viana et al., 2015).

CAPITULO 1 (ARTIGO)

EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36 COM A UTILIZAÇÃO DE DUAS ADMINISTRAÇÕES DE FSH, EM ANIMAIS DA RAÇA ANGUS (*Bos taurus*)

RESUMO

A TE é uma biotecnologia amplamente utilizada que envolve a realização de protocolos de superestimulação para indução de ovulações múltiplas. A superestimulação é realizada durante 4 dias (12/12h) com doses decrescentes de pFSH, porém estudos mostram que pFSH associado a diluentes de absorção lenta, diminui o número de aplicações, mantendo uma produção de embriões semelhante. Assim o objetivo deste trabalho foi comparar o protocolo convencional para SOV com o de redução de manejos. Vinte e quatro (n=24) vacas doadoras foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Controle e MAP-5 (delineamento cross-over). No D0, as doadoras receberam um DIV contendo 1,0 g de progesterona e 3 mg de benzoato de estradiol IM. No grupo controle, os animais foram superestimulados com pFSH (IM, dose total 200 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D4 ao D7, enquanto que no grupo MAP-5 foram realizadas somente duas administrações (D4 75% e D6 25% da dose). As coletas de embriões foram realizadas no D15. A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento Mixed (SAS) considerando 5% de significância, sendo as variáveis: número de folículos, número de corpos lúteos, estruturas totais, estruturas fertilizadas e embriões viáveis. O grupo controle demonstrou-se significativamente melhor que o grupo MAP-5 quanto ao número de folículos, corpos lúteos e taxa de ovulação. Quanto ao número de estruturas totais, estruturas fertilizadas e embriões o grupo controle também demonstrou diferença significativa quando comparado ao MAP-5. O que demonstra que a redução dos manejos proposta com o grupo MAP-5 não foi eficaz para doadoras da raça Angus.

Palavras-chave: Tranfêrencia de Embriões, Coleta de Embriões, ácido hialurônico (MAP-5), pFSH (Folltropin).

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, a pecuária de corte no Brasil sofreu um enorme ganho de volume e produtividade, sendo o maior rebanho comercial de bovinos do mundo e o maior exportador de carne mundial bovina (ASBIA, 2015). Na região sul do Brasil predomina a criação de animais de raças europeias (*Bos taurus*) e no gado de corte destaca-se a raça Angus devido às suas características como: rusticidade, precocidade, fertilidade, facilidade de partos, habilidade materna e, principalmente, qualidade da carne. Este 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.

Do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo é um dos principais focos da pecuária (Neves et al., 1999). A indução de ovulação múltipla (superovulação – SOV) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais utilizadas atualmente e visa acelerar o melhoramento genético do rebanho. Esta técnica tem como objetivo, obter o máximo de embriões aliado a altas taxas de prenhez (Mapletoft e Pierson, 1993). Entretanto os protocolos de SOV requerem atenção frequente por pessoas treinadas para minimizar as chances de erros na sua execução (Tríbulo et al., 2011) e a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório ainda está entre os maiores problemas nos programas comerciais de TE (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001).

Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo denominado P36 que permite a realização da IA em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras. No entanto, a utilização do protocolo P-36 em raças européias não se demonstrou tão eficaz, se fazendo necessário atrasar a indução da ovulação para 24h após a retirada do dispositivo de progesterona (Martins et al., 2005; Chesta et al., 2007; Rosa, 2010). Esta superestimulação convencional conta com 8 doses decrescentes de

pFSH com intervalo de 12 horas entre as administrações, necessita de pessoal treinado, manejo adequado e mão de obra qualificada (Tribulo et al., 2011), o que pode comprometer a resposta superovulatória devido a alterações no pico pré-ovulatório de LH por estresse e condição inadequada de manejo (Bó et al., 1994; Stoebel e Moberg, 1982), pois doadoras submetidas ao estresse apresentam um menor número de corpos lúteos no dia da coleta de embriões (Edwards et al., 1987).

Dessa forma, alguns autores vêm buscando alternativas para diminuir o número de manejos. Murphy e Martinuk, (1991) e Baruseli et al. (2011) testaram a utilização de eCG em dose única, reduzindo o manejo e obtendo sucesso superovulatório, porém o eCG apresenta metabolização mais lenta (meia-vida alta, ao redor de 10 dias; Dieleman et al., 1993), o que provoca uma longa superestimulação e anormalidades no perfil endócrino, reduzindo a qualidade embrionária (Mikél et al., 1982; Moor et al., 1984). Baruselli et al. (2011) demonstraram que após a terceira SOV consecutiva a um decréscimo na produção de embriões isso devendo-se possivelmente pela produção de anti-corpos contra eCG.

O FSH apresenta sua meia-vida ao redor de 5 horas, o que exige aplicações diárias a cada 12 horas (Laster et al., 1972; Demoustier et al., 1988). Uma alternativa para isso seria prolongar a meia-vida do FSH. Nesse intuito, alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos visando a SOV com administração subcutânea de pFSH em dose única (Bó et al., 1994). Esta via possibilitaria uma liberação mais lenta de FSH quanto comparado a via intramuscular. Os resultados de Bó (1994) demonstraram semelhança entre os dois métodos. Da mesma forma, quando se fraciona a administração de pFSH em 75% no dia de iniciar a SOV e 25% no dia da administração de prostaglandina pela via subcutânea, os resultados obtidos são semelhantes aos do grupo controle, porém com diminuição numérica do número de embriões transferíveis (Lovie et al., 1994).

Outra alternativa para reduzir o número de manejos na aplicação de FSH, seria a diluição em meios que retardem a sua

absorção e aumentem a sua meia-vida. Assim vários trabalhos nesta linha estão sendo desenvolvidos visando adequar o meio diluente ao protocolo superovulatório. Tribulo et al., (2011) utilizando ácido hialurônico e Kimura et al., (2007) utilizando hidróxido de alumínio obtiveram resultados semelhante entre grupos tratado e controle. Bó e Mapletoft, (2014), utilizando diluente a base de ácido hialurônico, verificaram que a resposta superestimulatória era melhor quanto se utilizava um esquema de doses decrescentes (2 doses na proporção 70/30). Embora alguns trabalhos tenham mostrado a possibilidade da redução do número de manejos em protocolos SOV ainda existem muitas perguntas a serem respondidas, pois os resultados ainda são muito variáveis.

Este trabalho tem o objetivo de avaliar e comparar a resposta de protocolos SOV convencional (8 aplicações) com protocolo SOV (FSH diluído em ácido Hialurônico/2 aplicações) na obtenção de embriões viáveis. Verificar se o protocolo superovulatório utilizando MAP-5 como diluente, com apenas 2 administrações, apresenta taxas de produção embrionária e resposta ovariana compatíveis ao protocolo SOV convencional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Central ABN agropecuária sediada na Fazenda Bananeiras (ABN Agropecuária) no município de Maçambará, no estado do Rio Grande do Sul (latitude 29° 08'34"S, longitude 56°03'54"E, altitude 110 m), durante o período de junho a outubro de 2015.

A Central ABN Agropecuária fundada em 1984, destaca-se pela sua excelência na produção de embriões.

2.2 ANIMAIS

Durante a realização do experimento as doadoras ficaram em campo nativo (*Brachiaria plantaginea* e *Digitaria sanguinalis*) recebendo feno pré-secado (*Avena stigosaschreb*) a vontade pela parte da manhã e no período da tarde eram mantidas em pastagem de aveia (*Avena stigosaschreb*), recebendo sal mineral e água *ad libitum*. As doadoras da raça Angus foram mantidas nas condições acima descritas com suplementação mineral por um período de adaptação antes do início do experimento, e também adaptadas às condições climáticas e ao manejo da propriedade.

Todas as doadoras já tinham sido superestimuladas anteriormente com doses diferentes de pFSH, onde se constatou que a dose ideal para SOV era 200 mg de pFSH. As vacas (n=24) do experimento foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Controle e MAP-5. Todos os animais passaram pelos dois grupos, que resultaram em 24 vacas por grupo/tratamento, em um delineamento experimental cross-over.

Os hormônios utilizados foram adquiridos todos da mesma partida e administrados rigorosamente às 7:00h e às 19:00h. O diluente MAP-5 foi formulado e fornecido pela empresa responsável em partida única. Os hormônios foram todos diluídos na propriedade.

O sêmen utilizado durante todo o experimento foi de dois touros da raça Angus sempre utilizando palhetas da mesma partida e mantendo o acasalamento durante todo o experimento. O sêmen foi avaliado previamente ao experimento utilizando os testes de termorresistência lento e rápido observando os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

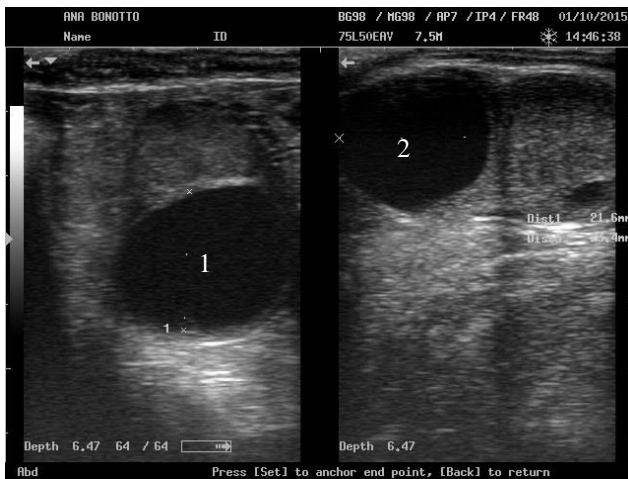
Previamente ao início do experimento foi realizado exame ginecológico completo nas doadoras com vaginoscopia e também ultrassonografia transretal (Mindray DP 3300-Vet, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, MindrayBio-Medical electronics Co. Ltda, Sheuzheu,

China). Todas as vacas incluídas no experimento apresentaram saúde reprodutiva e estavam livres de doenças espécie/específicas, pois a propriedade conta com um manejo sanitário rigoroso.

2.3 PRÉ-EXPERIMENTO

Em um estudo preliminar as mesmas vacas utilizadas no experimento, foram submetidas aos mesmos tratamentos (controle e MAP-5), porém a indução da ovulação foi realizada com a administração de 0,075mg de um análogo de GnRH (Gonadorelina, via IM, Gestran Plus® Tecnopec, São Paulo, Brasil).

Figura 1: Imagem dos ovários direito e esquerdo com presença de folículos grandes no dia da coleta da doadora AN1987 do grupo MAP-5, no experimento preliminar.



Fonte: próprio autor (2015).

2.4 EXPERIMENTO

Previamente ao início do experimento, as 24 vacas foram avaliadas com ultrassom para verificar a qualidade de útero e a condição ovariana (população de folículos, presença de corpo lúteo e ocorrência de cisto folicular). Após esse procedimento as doadoras foram divididas entre os grupos de forma aleatória e então foram iniciados os protocolos. Em um dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0), foi introduzido um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1 g PRIMER®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e administrado 2 ml de benzoato de estradiol (BE 2 mg, via IM, RIC-BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). As coletas de embriões foram realizadas com duas doadoras de cada grupo por dia. Ao término desta etapa, os animais começaram a superovulação de acordo com cada grupo (protocolo).

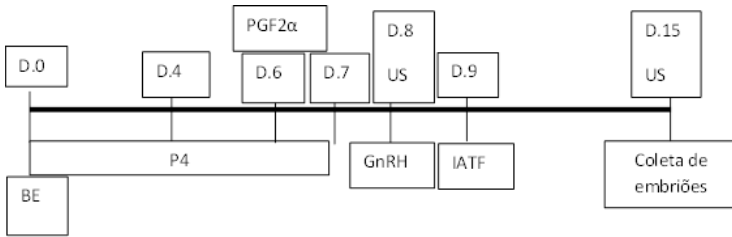
2.4.1 Grupo Controle

Quatro dias mais tarde (D4) iniciou-se o tratamento superestimulatório com 200mg de pFSH (FSH, 200 mg, via IM, Folltropin-V®, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos (40, 30, 20 e 10% da dose total respectivamente), totalizando 8 aplicações. No dia seis (D6) às 7h foi administrada uma dose luteolítica de um análogo da prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 150 mg, via IM, de d-cloprostenol, Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil).

Trinta e seis horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D7 às 19 h), o dispositivo intravaginal contendo progesterona foi removido. E a indução da ovulação realizada através da administração de um análogo de GnRH (Gonadorelina, 0,125 mg, via IM, Gestran Plus® Tecnopec, São Paulo, Brasil), no dia oito (D8) às 19 h, ou seja, sessenta horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Os animais foram inseminados em tempo fixo (IATF), sem a observação de cio, 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH.

Figura 2: protocolo de superestimulação em doadoras da raça Angus (grupo controle).

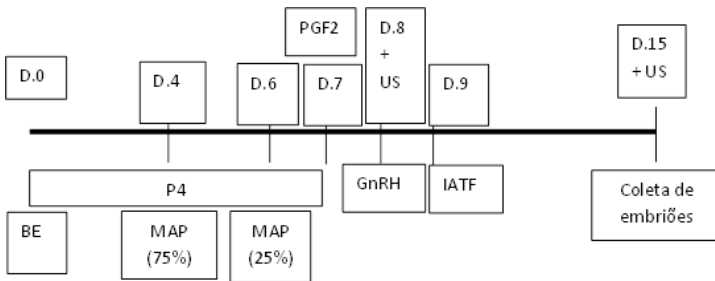


Fonte: próprio autor (2015)

2.4.2 Grupo MAP-5

Semelhante ao grupo controle, porém em vez da superestimulação convencional com 200mg pFSH, foi realizada duas aplicações (D4 e D6) de pFSH diluído em MAP-5 (5mg/mL de ácido hialurônico, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) com a dose correspondente a 75 e 25% do total (200mg).

Figura 3: protocolo de superestimulação em doadoras da raça Angus (grupo controle).



Fonte: próprio autor (2015)

2.5 COLETA DE EMBRIÕES

A coleta de embriões era realizada pelo método não cirúrgico (no D15), através de lavagem uterina com tampão fosfato-salina (PBS). Os embriões eram avaliados e classificados como viáveis, degenerados ou não fertilizados. Os embriões viáveis eram classificados de acordo com a qualidade em grau 1 (GI, excelente), grau 2 (GII, bom), grau 3 (GIII, regular) e grau 4 (GIV, pobre).

Figura 4: embriões coletados durante a realização do experimento.



Fonte: próprio autor (2015)

2.6 ULTRASSONOGRAFIA

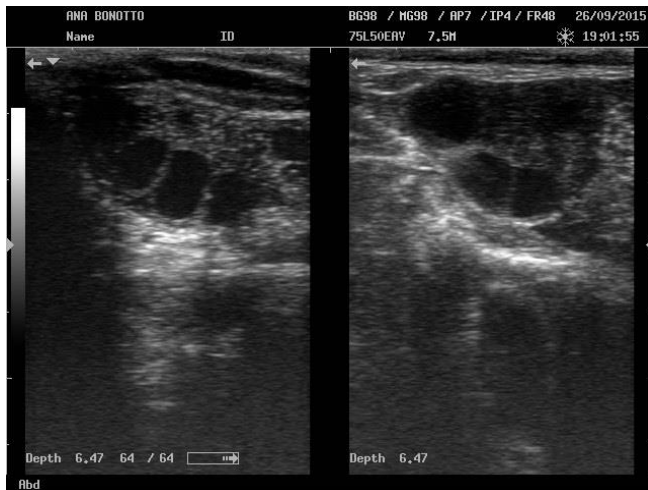
As doadoras foram avaliadas com o auxílio do aparelho de ultrassonografia (Mindray DP 3300-Vet, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Mindray Bio-Medical electronics Co. Ltda, Sheuzheu, China) nos dias descritos abaixo:

- No D0 era avaliada a condição ovariana de cada doadora e em qual fase do ciclo estral a mesma se encontrava.

- No D8 era avaliado a resposta superestimulatória através da contagem de folículos maiores que 8mm (Figura 5 e 6).

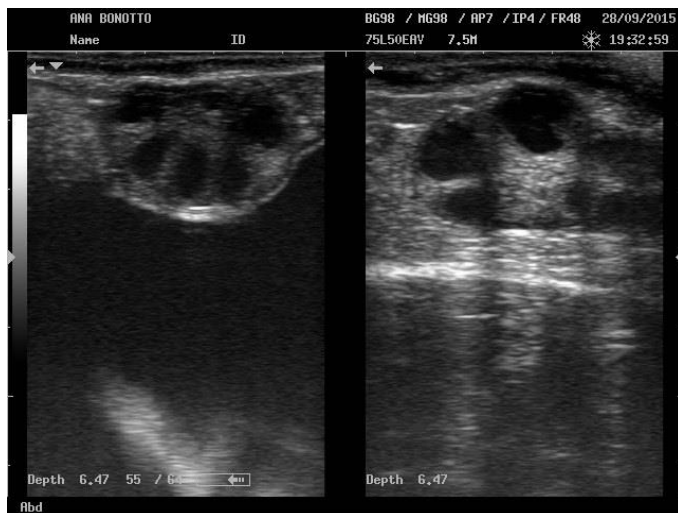
- No dia da coleta dos embriões (D15) era avaliado número de corpos lúteos para estimar a resposta ovulatória (Figura 7 e 8).

Figura 5: Imagem dos ovários direito e esquerdo da doadora 2415 superovulada no grupo controle no dia da IA.



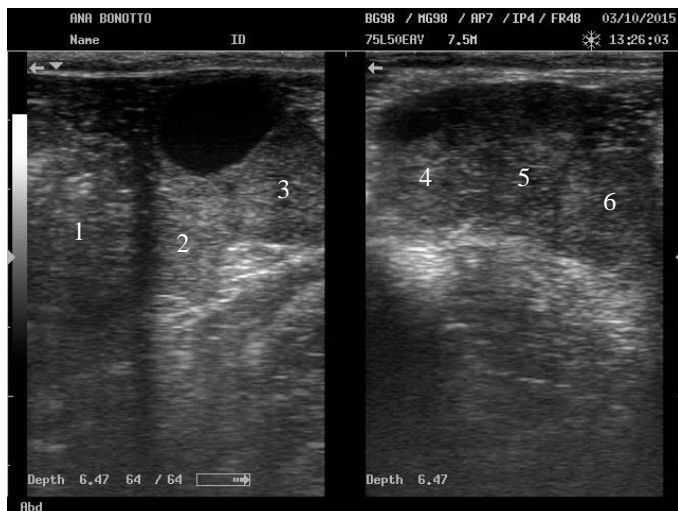
Fonte: próprio autor (2015)

Figura 6: Imagem dos ovários direito e esquerdo da doadora 3020 superovulada no grupo MAP-5 no dia da IA.



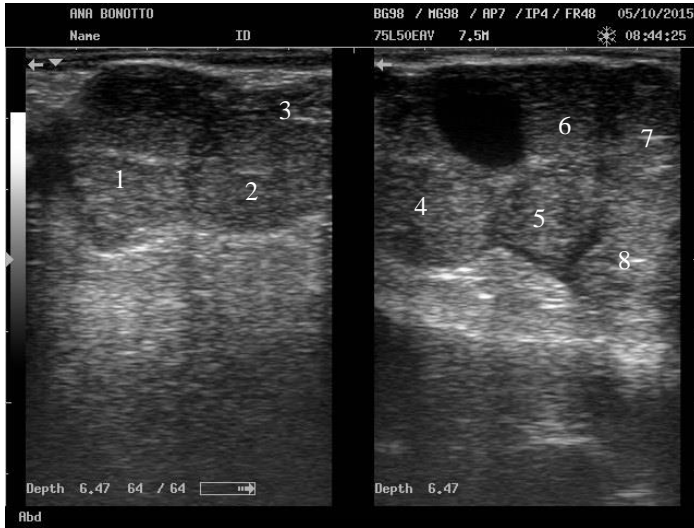
Fonte: próprio autor (2015)

Figura 7: Imagem dos ovários direito e esquerdo da doadora 2415 superovulada no grupo controle no dia da coleta de embriões.



Fonte: próprio autor (2015)

Figura 8: Imagem dos ovários direito e esquerdo da doadora 3020 superovulada no grupo MAP-5 no dia da coleta de embriões.



Fonte: próprio autor (2015)

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis número de folículos, número de corpos lúteos, número de estruturas totais coletadas, estruturas fecundadas e estruturas viáveis nos grupos foram submetidas a análise de variâncias do pacote estatístico SAS, nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Não foi observado efeito do peso dos animais durante o experimento. Os animais apresentaram média de 541,1 kg. Os touros utilizados também não interferiram nos resultados ($p>0,05$).

No experimento 1 (pré-experimento) foram superovuladas 24 vacas distribuídas aleatoriamente nos 2 grupos Controle e MAP. A utilização de 0,075mg de gonadorelina como indutor de ovulação mostrou-se ineficiente em induzir a ovulação pois foi observado baixo número de corpos lúteos e um grande número de folículos no dia da coleta dos embriões (D15). Isso refletiu no número de estruturas coletadas (tabela 1). Desta forma, optou-se por aumentar a dose de GnRH para fornecer uma maior taxa de ovulação.

Tabela 1: Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200 mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis número de folículos, número de corpos lúteos no dia da coleta, estruturas totais, estruturas fecundadas e embriões viáveis estão expressas em valores médios.

	CONTROLE (n=13)	MAP-5 (n=13)
Número de Foliculos (D15)	2,50	3,15
Número de CLs (D15)	7,07	4,46
Estruturas Coletadas	8,07	6,92
Estruturas Fecundadas	5,46	5,00
Embriões Viáveis	3,84	3,61

Fonte: próprio autor (2015)

No experimento 2, a dose de gonadorelina foi ajustada para 0,125mg em ambos os grupo (controle e MAP-5). O número de

folículos no D8 que se desenvolveram nas vacas superovuladas do grupo controle ($10,08 \pm 0,61$) foi maior ($p=0,0275$) que no grupo MAP-5 ($8,25 \pm 0,61$). Foi observada diferença ($p < 0,0001$) também no número de corpos lúteos no dia da coleta das vacas Controle em relação as vacas do grupo MAP-5 ($7,25 \pm 0,59$ vs. $3,25 \pm 0,59$, respectivamente).

A taxa de ovulação foi melhor nas vacas do grupo controle (71,90%) em comparação as vacas superovuladas com o diluente MAP-5 (39,4%). Estes resultados podem ser melhor visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200 mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis número de folículos (D8), número de corpos lúteos (D 15) no dia da coleta e taxa de ovulação estão expressas em valores médios com o erro padrão da média.

	CONTROLE (n=24)	MAP 5 (n=24)	Valor de p
Número de Fol. (D8)	10,08±0,61a	8,25±0,6b	0,0276
Número de CIs (D15)	7,25±0,59a	3,25±0,5b	<0,0001
Taxa de Ovulação	71,90%	39,39%	

As letras (a, b), demonstram diferença significativa entre as colunas.

Fonte: próprio autor (2015)

As vacas superovuladas com 200mg NIH-FSH-P1Folltropin-V diluído em MAP-5 apresentaram menor ($p=0,0002$) número de estruturas totais quando comparado as vacas controle ($8,29 \pm 0,98$ vs. $3,08 \pm 0,98$, respectivamente).

Além disso, as vacas do grupo Controle apresentaram maior número de estruturas fertilizadas ($6,50 \pm 0,90$ vs. $2,50 \pm 0,90$; $p=0,0015$)

bem como de embriões viáveis ($4,21 \pm 0,72$ vs. $2,00 \pm 0,72$; $p=0,0164$; Tabela 3).

Tabela 3: Resposta superovulatória de vacas *Bos taurus* tratadas com 200 mg NIH-FSH-P1Folltropin-V administrado em doses decrescentes por 4 dias (Controle) ou 2 aplicações com 75% da dose no D4 e 25% no D6. As variáveis estruturas totais, estruturas fecundadas e embriões viáveis estão expressos em valores médios com o erro padrão da média.

	CONTROLE (n=24)	MAP 5 (n=24)	Valor de p
Estruturas Coletadas	8,29±0,98a	3,08±0,98b	0,0002
Estruturas Fecundadas	6,50±0,90a	2,50±0,90b	0,0015
Embriões Viáveis	4,21±0,72a	2,00±0,72b	0,0164

As letras (a, b), demonstram diferença significativa entre as colunas.

Fonte: próprio autor (2015)

4 DISCUSSÃO

Protocolos de superovulação buscando um menor número de aplicações de FSH e consequentemente menor número de manejos tem, sido investigado por várias equipes ao redor do mundo.

Vários trabalhos já demonstraram que o estresse repetido em fêmeas doadoras de embriões pode atrasar o pico pré-ovulatório de LH (Stoebel e Moberg, 1982). Isso poderia diminuir o número de corpos lúteos no momento da coleta (Edwards et al., 1987), o que atrapalharia a resposta superovulatória (Tribulo et al., 2011). No presente trabalho foi testado um protocolo com diminuição no número de manejos, onde o hormônio FSH era diluído em substância contendo ácido hialurônico (MAP-5). Nenhuma das variáveis analisadas mostraram vantagem neste procedimento sendo sempre inferiores as vacas do grupo controle.

Estes resultados nos fazem pensar como seria a dinâmica farmacológica da meia-vida do FSH diluído em MAP-5. Viana et al. (2015) demonstraram que diluição do pFSH em 5mg/mL de ácido hialurônico e injeção em dose única, pode aumentar a concentração plasmática de FSH em relação ao controle (esquema de aplicação a cada 12 em 12 horas). Estes autores verificaram também que os níveis de pFSH atingiram um pico ao redor de 12 horas após a aplicação, mantendo-se semelhantes as concentrações do controle até as 96 horas pós aplicação.

No presente experimento o pFSH foi diluído na concentração de 5mg/mL conforme sugerido pelos autores citados acima, porém a resposta superovulatória foi inferior aquela das vacas controle. Uma provável explicação para esta diferença nos resultados pode ser atribuída a diminuição significativa das concentrações circulantes de pFSH que se mantiveram abaixo do limiar superovulatório. Infelizmente no presente trabalho, não foram realizadas análises sanguíneas para dosagem hormonal para comprovar essa hipótese. Alguns autores atribuem ainda que o próprio metabolismo animal pode interferir nas concentrações circulantes de FSH (Demoustier et al., 1988). Além disso, estudos com

administração subcutânea de pFSH também não se mostraram eficientes (Hill et al., 1985; Lovie et al., 1994) com baixas taxas superovulatórias. Os autores atribuíram a esses baixos resultados ao metabolismo animal.

Uma variável que chama a atenção na análise dos dados é o número de folículos recrutados em cada protocolo superovulatório (Controle: $10,08 \pm 0,61$; MAP-5: $8,25 \pm 0,61$; $p=0,0276$). Podemos observar que as vacas superovuladas no método convencional apresentaram mais folículos em crescimento do que as vacas do grupo MAP-5. Isso reforça a hipótese de que a quantidade de FSH circulante tenha sido insuficiente para suportar o crescimento folicular nas vacas do grupo MAP-5, já que a manutenção dos níveis de pFSH durante o tratamento favorece o aumento na expressão de receptores de LH nas células da granulosa (Nogueira et al., 2007), fato este importante para que o folículo cresça e adquira a capacidade ovulatória (Simões et al., 2010).

Uma deficiência no crescimento folicular pode acarretar problemas de maturação nos folículos. Esta suspeita pode ser confirmada quando observamos a taxa de ovulação entre os experimentos 1 e 2. Mesmo dobrando a quantidade de GnRH (0,075 para 0,125mg) menos de 40% dos folículos presentes nos ovários das vacas do grupo MAP-5 ovularam. Esta baixa taxa de ovulação explica a diferença obtida no número de corpos lúteos no grupo controle e MAP-5 ($7,25 \pm 0,59$; $3,25 \pm 0,59$, respectivamente). Alguns trabalhos demonstraram que o uso de análogos de GnRH como indutores de ovulação resultam em taxa de ovulação de aproximadamente 85% (Pursley et al., 1995). Colazo et al. (2009) compararam a taxa de ovulação de vacas leiteiras na IATF. Esses autores verificaram grande variação nas taxas de ovulação quando compararam os 2 indutores, obtendo 44,3% de ovulações na utilização do GnRH e 62,4% com o LH. Resultados semelhantes também foram observados por Martinez et al. (1999) em que a taxa de ovulação com a indução por GnRH foi menor (56%) que com pLH (78%). Curiosamente, as vacas do grupo controle apresentaram taxa de ovulação condizente com a literatura (71,90%) mesmo utilizando um análogo do GnRH. Este fato nos faz pensar na

imaturidade dos folículos na hora da indução da ovulação nas vacas do grupo MAP-5. Folículos imaturos tem menos receptores de LH e por isso a incapacidade de ovular (Sartori et al., 2010). Um estudo mais aprofundado neste aspecto é necessário para comprovar se realmente foi isso que aconteceu.

Vários trabalhos tem demonstrado a possibilidade de diminuir o número de injeções de FSH durante a superovulação, mantendo resultados semelhantes ao método convencional (Bó et al., 1994; Kimura et al., 2007; Tríbulo et al., 2011; Tríbulo et al., 2012).

Tríbulo et al. (2011), utilizando o diluente a base de ácido hialurônico (MAP-5) na concentração de 20mg/mL, observaram diferença significativa no número de corpos lúteos entre os grupos controle e MAP-5 intramuscular (IM) ($13,31\pm 3,1$ e $11,0\pm 2,0$) quando comparado ao grupo MAP-5 subcutâneo (SC) ($4,2\pm 1,0$). Observou também diferença entre todos os grupos quanto ao total de embriões coletados (controle: $12,7\pm 4,0$; MAP-5 IM: $8,2\pm 2,0$ e MAP-5 SC: $2,0\pm 1,4$), estruturas fertilizadas (controle: $10,8\pm 3,8$; MAP-5 IM: $5,8\pm 1,7$ e MAP-5 SC: $1,3\pm 1,1$) e embriões transferíveis (controle: $8,5\pm 2,7$; MAP-5 IM: $4,7\pm 1,6$ e MAP-5 SC: $1,3\pm 1,1$). Os mesmo autores utilizando vacas doadoras da raça Brangus, também observaram um aumento significativo na resposta superovulatória do grupo controle em relação ao grupo MAP-5 (pFSH diluído em 10mg/mL) quanto aos embriões fertilizados ($19,4\pm 3,6$ vs. $10,1\pm 1,6$) e uma tendência quanto aos embriões transferíveis ($13,5\pm 3,2$ vs. $6,9\pm 1,3$) (Tríbulo et al., 2012). Neste mesmo estudo os autores chegaram a conclusão que a concentração de 5mg/mL era a ideal para se obter bons resultados em relação ao número de embriões viáveis colhidos (Controle: $4,0\pm 0,8$; MAP-5 10mg/mL: $5,0\pm 0,9$; MAP-5 5mg/mL: $6,1\pm 1,3$).

Para evitar variações nos resultados do presente trabalho, procurou-se nos experimentos, utilizar metodologia similar a apresentada por Tríbulo et al. (2012) como sendo a ideal (5mg/mL). Surpreendentemente, os resultados do nosso trabalho foram muito diferentes, apresentando baixo número de estruturas totais, fertilizadas e

de embriões viáveis por vaca coletada do grupo MAP-5 em relação ao Controle ($3,05 \pm 0,98$ vs. $8,29 \pm 0,98$; $2,50 \pm 0,90$ vs. $6,5 \pm 0,90$; $2,00 \pm 0,72$ vs. $4,21 \pm 0,72$, respectivamente).

Uma variável que divergiu dos protocolos aqui realizados daquela de Tribulo et al. (2012) foi a quantidade superovulatória de FSH. No estudo de Tribulo et al. (2012) foram utilizados 300mg de FSH e no atual experimento 200mg. Acreditamos que essa variação nos resultados não seja pela quantidade menor de FSH, visto que, as vacas do grupo controle também receberam a mesma dosagem e mesmo assim superovularam. Além do que, em trabalhos prévios, a dose de 200mg de FSH foi ajustada as doadoras dos experimentos como sendo a ideal para a superovulação.

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que a administração de 200 mg de pFSH em dose única diluído em ácido hialurônico (5mg/mL) não foi eficaz como alternativa para protocolo superestimulatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C., GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J ReprodFertil**, 94:177– 88, 1992.

ALBERTINI DF, COMBELLES CMH, BENECCHI E, CARABATSOS MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. v. 121, p. 647-653, 2001.

ALBIERO, W., STAMPFLI, H., MARKEL, M., POPKIN, C., BAUM, anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**., 39:25–42, 1993.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, 39: 7-24, 1993.

ASBIA. **Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de sêmen**. (ed. by Artificial ABdI), 2015.

BARROS C.M., NOGUEIRA M.F.G. Embryotransfer 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. **EmbryoTransfer 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., 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, P.S., FERREIRA, R.M., SALES, J.N.S., GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., MARTINS, C.M., RODRIGUES, C.A., BÓ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1583-1593, 2011.

BERGQVIST, A.S., YOKOO, M., BGE, R., SATO, E., RODRIGUEZ-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.Reproduction.Sci.**, v.39, p.193-204, 1995.

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

BÓ, G.A., GUERRERO, D.C., TRÍBULO, A., TRÍBULO, H., TRÍBULO, R., ROGAN,D., MAPLETOFT, R.J. New approaches to superovulation in the cow. **Csiro Publishing – Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.106-112, 2010.

BÓ, G.A., MAPLETOFT, R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.81, p.39-48, 2014.

BÓ, G.B., HOCKLEY, D.K., NASSER, L.F., MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. **Theriogenology**, v.42, ed.6, p.963-975, 1994.

BOLAND, M.P.R., ROCHE, J.F. Embryo production: alternative methods. **MolReprDev**, 36: 266-270, 1993.

BURATINI J., PRICE C., VISINTIN J. & BO G. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology** 54, 421-31, 2000.

CARVALHO, P.D., HACKBART, K.S., BENDER, R.W., BAEZ, G.M., DRESCH, A.R., GUENTHER, J.N., SOUSA, A.H., FRICKE, P.M. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminar study. **Theriogenology**, v.82, p. 481-489, 2014.

CHESTA, P., TRIBULO, L., TRIBULO, H., BALLA, E., BARUSELLI, P., BÓ, G. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. **Repr, Fert and Dev**, 307, 2007. (resumo)

CLOSSET, J., GILLARD, J.L., ECTORS, F. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, 30:379-386, 1988.

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.

DEMEESTERE I., CENTNER J., GERVY C., ENGLERT Y., DELBAERE A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*. 130: 147–156, 2005.

DEMOUSTIER, M.M., BECKERS, J.F., VAN DER ZWALMEN, P., DIELEMAN SJ, BEVERS MM. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulatedcattle. **MolReprod Dev.**, v.36(2) p.271-3, 1993.

DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M, Vos PLAM, De Loos FAM. PMSG/ EDELMAN, R., WASSERMAN, S.S., BODISON, S.A., PERRY, J.G., O'DONNOGHUE, M., DETOLLA, L.J. Phase II safety and immunogenicity study of type F botulinum toxoid in adult volunteers. **Vaccine**. 21:4335–47, 2003.

EDWARDS, L.M., RAHE, C.H., GRIFFIN, J.L., WOLFE, D.F., MARPLE, D.N., CUMMINS, K.A., et al. Effect of transportation stress

on ovarian function in superovulated Hereford heifers. **Theriogenology**, 28:291–9, 1987.
Endocr Ver., 12:27–44, 1991.

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 *Bosindicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852-858, 2008.

GINTHER O.J., WILTBANK M.C., FRICKE P.M., GIBBONS J.R. & KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. **BiolReprod** 55, 1187-94, 1996.

GINTHER, O.J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Reprod. Fertil.**, v.87, p.223-30, 1989.

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.

GODKE, R.A. A single 50 mg injection of follicle stimulating hormone (FSH) for superovulation of embryo donor cattle. **Theriogenology**, 23:196, 1985. (resumo)

GUERRA, A.G., TRÍBILO, A., YAPURA, J., SINGH, J., MAPLETOFT, R.J. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, v.78, p.353-360, 2012.

GUERRA, A.G., TRIBULO, A., YAPURA, J., SINGHC, J., MAPLETOFT, R.J. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. **Theriogenology**, 78, 353–360, 2012.

HILL, K.G., MCFARLAND, C.W., RORIE, R.W., VIKER, S.D.,

HORTON E.W, POYSER N.L. Plasma progesterone levels in guinea-pigs actively immunized against prostaglandin F2alpha, hysterectomized or treated with intra-uterine indomethacin. **J Endocrinol.**, v.67(1) p.81-8, 1975.

KAPLAN, L., LU, Y., SNITZER, J., NEMKE, B., HAO, Z., BIRO, S., KIMURA, K., HIRAKO, M., IWATA, H., AOKI, M., KAWAGUCHI, M., SEKI, M. Successful seprovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. **Theriogenology**, v.68, p.633-639, 2007.

LASTER, D. Disappearance of and uptake of I125 FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. **JReprodFertil**, 30:407-15, 1972.

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, C.R., BOUTTE, B.W., ARCHBALD, L.F., GODKE, R.A. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. **Theriogenology**, 15:13-22,1981.

LOONEY, C.R., PRYOR, J.H. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. **AnimReprod**, v.9, n.3, p.404-413, 2012.

LOVIE, M., GARCIA, A., HACKETT, A., MAPLETOFT, R. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in Holstein cows. **Theriogenology**, 41:241, 1994.

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.

MANHALTER, J.W., NEYCHEV, H.O., ZLABINGER, G.J., AHMAD, R., EIBL, M.M. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminum hydroxide: effect of antigen uptake and antigen presentation. **ClinExpImmunol**, 61: 143-51, 1985.

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

MARTINEZ, H. Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductalepithelium. **JReprodDev**, 51:445-453, 2005.

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.

MERTON, J.S., DE ROOS, A.P.W., MULLAART, E., DE RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P.L.A.M. AND DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, 59: 651-667, 2003.

MIKÉL JENSEN, A., GREVE, T., MADEJ, A., EDQVIST, L.E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2a treated cow. **Theriogenology**, 18:33-4, 1982

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

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

MOOR, R.M., KRUIP, ThAM., GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? **Theriogenology**, 21:103-16, 1984.

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

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.

NEUSTADT, D., CALDWELL, J., BELL, M., WADE, J., GIMBEL, J. Clinical effects of intraarticular injection of high molecular weight hyaluronan (Orthovisc) in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled, multicenter trial. **J Rheumatol**, 32:1928-1936, 2005.

NEVES, K. W.; BAILEY, T. L.; GARST, A. S.; PRYOR, A. W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R. M.; EYESTONE, W. E.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1731–1740, 1999.

NIBART M, SILVA PM, THUARD JM, DURAND M, GUYADER-JOLY C, PONCHON S, MARQUANT LE GUIENNE B, HUMBLLOT P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. **RencRechRumin**, v.2, p.399-402, 1995.

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. **RevistaActa Scientiae Veterinariae**;31(sup.):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 Nelorecattle. **Theriogenology**, v. 67, p.655-660, 2007.

RENESTO, A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultra – sonografia e superovulcao na produção in vitro e in vivo de embriões**. Disertacao de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal – SP, 2004.

ROBERSON M.S., WOLF M.W., STUMPF T.T., KITTOCK R.J., KINDER J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteumfunction

in cows receiving two levels of progesterone. **Biol. Reprod.**, v.45, p.997-1003, 1989.

ROSA, F.S. **Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Angus.** Dissertação de mestrado, UNESP-Botucatu, 2010.

S. The effect of early hyaluronic acid delivery on the development of an acute articular cartilage lesion in a sheep model. **Am J Sports Med**, 37:2323-2327, 2009.

SARTORI, R., BASTOS, M. R., MATTOS, M.C.C. Physiological bases for understanding estrous cycle differences between Bos Taurus and Bos indicus. **Acta Scientiae Veterinariae** (UFRGS, Impresso), v.38, p. s287-s295, 2010.

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 Fertil**, 83: 663-671, 1988.

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. **BiolReprod**, 39: 308-317, 1988.

SOTOEBEL, D.P. and MOBERG, G.P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. **J. Dairy Science**, v.65, p.92-96, 1982.

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. **Theiogenology**, v.45 p.1091-1102, 1996.

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.

TRÍBULO, A., ROGAN, D., TRÍBULO, H., TRÍBULO, R., ALASINO, R.V., BELTRAMO, D., BIANCO, I., MAPLETOFT, R.J., BÓ, G.A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Animal Reproduction Science**, v.129, p. 7-13, 2011.

TRÍBULO, A., ROGAN, D., TRÍBULO, H., TRÍBULO, R., MAPLETOFT, R.J., BÓ, G.A. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. **Theriogenology**, v.77, p.1679-1685, 2012.

VAN LEEMPUT E, VOS P, HYTTEL 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, F.P., VIEIRA, L.M., GUERREIRO, B.M., FREITAS, B.G., BORGES FILHO, G.N., BÓ, G.A., MAPLETOFT, R.J., BARUSELLI, P.S. Perfil plasmático de FSH após aplicação de dose única de p FSH diluído em ácido hialurônico. **Animal Reproduction** v.12 n.3, p.711, 2015. (resumo)

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.