

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA DE VACAS EM
LACTAÇÃO TRATADAS COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula Martini

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA DE VACAS EM LACTAÇÃO
TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
PROGESTERONA**

por

Ana Paula Martini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de

Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Co-orientador: James Richard Pursley

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA DE VACAS EM LACTAÇÃO
TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
PROGESTERONA**

elaborada por
Ana Paula Martini

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra
(Presidente/Orientador)

Mari Lourdes Bernardi, Dra (UFRGS)

Julio Viégas, Dr (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Marilene, pela vida, educação, amor e incentivo ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos, Juliana e Filipe, por sempre estarem me apoiando.

Ao meu noivo Gilson pelos ensinamentos compartilhados, auxílio na execução deste trabalho, pela amabilidade, amizade, compreensão e amor.

Ao Dr. James Richard Pursley pela co-orientação e pelos ensinamentos ao longo da minha estadia nos EUA e auxílio na confecção de minha dissertação.

Ao Med. Vet. João Paulo Martins pelo auxílio durante as atividades de campo e análise estatística e aos técnicos Wang Dongliang e Mu Nanheng pelo auxílio durante as atividades de campo.

À empresa canadense Bioniche Life Science Inc. pela doação do FSH.

À equipe Embryolab pelos conhecimentos compartilhados, auxílios e companheirismo. Em especial aos pós-graduandos (Janislene Mach Trentin, Julia Brum Spreckelsen Casarin e Gilson Antonio Pessoa) durante este período de convivência.

À família Nobis que gentilmente cedeu sua propriedade para execução do projeto sem medir esforços nas exaustivas jornadas de trabalho, inclusive aos finais de semana.

À Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin, pelos ensinamentos ao longo da vida acadêmica e pela orientação no mestrado. Pela disponibilidade e dedicação aos valiosos ensinamentos transmitidos, além de todo apoio dispendido.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de estudo.

Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA DE VACAS EM LACTAÇÃO TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA

AUTOR: ANA PAULA MARTINI
ORIENTADORA: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
CO-ORIENTADOR: JAMES RICHARD PURSLEY
Santa Maria, 23 de fevereiro de 2015

Protocolos de superovulação com diferentes concentrações de progesterona foram avaliados sobre o percentual de folículos ovulados em vacas leiteiras de alta produção. Vinte e cinco fêmeas foram distribuídas em grupo controle (não tratadas; n=5) e quatro tratamentos com uso de dispositivos intravaginais de progesterona (CIDR): CIDR novo ou usado, por 4 ou 5 dias (n=5 em cada tratamento). Todas as vacas receberam prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF) e GnRH via IM. No Dia 10 (D10) do ciclo estral iniciou o tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH) em 9 doses decrescentes, por 4,5 dias. Concomitante com a 5ª e 6ª aplicação de FSH as vacas receberam PGF. Os ovários foram avaliados diariamente por ultrassonografia transretal para determinar o início da segunda onda folicular, o recrutamento e crescimento dos folículos, bem como o monitoramento das ovulações. O CIDR usado por 4 dias resultou em maior percentual de folículos ovulados entre 36 e 60h após a remoção do dispositivo (94,9%; $P < 0.0001$) comparado ao controle (49,5%) e tratamentos: CIDR usado 5 (68,3%), CIDR novo 4 (52,8%) e CIDR novo 5 (70,6%). A inseminação artificial deste protocolo é recomendada entre 24 a 36h após a retirada do CIDR usado por 4 dias. O número de folículos das vacas controle ($38 \pm 9,27$), CIDR usado 4 ($31,4 \pm 6,8$), CIDR novo 4 ($31 \pm 4,6$), CIDR usado 5 ($33,4 \pm 8,4$) e CIDR novo 5 ($38,6 \pm 10,6$) foi similar ($P = 0.739$). Confirma-se a hipótese de que baixo nível de progesterona exógena durante o tratamento com FSH permite pulsos de hormônio luteinizante suficientes para indução da ovulação.

Palavras-chave: níveis de progesterona, ovulação, superovulação, transferência de embriões, vacas leiteiras.

ABSTRACT

Master's dissertation
Post-Graduate Course in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

SUPEROVULATORY RESPONSE OF LACTATING DAIRY COWS TREATED WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PROGESTERONE

AUTHOR: ANA PAULA MARTINI
ADVISER: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
CO ADVISER: JAMES RICHARD PURSLEY
Santa Maria February 23th, 2015

The efficiency of superovulation protocols with different levels of progesterone in dairy cows was evaluated on the ovulated follicles rate. Twenty five high producing female were distributed in control group (n = 5), and four treatments with progesterone device (CIDR). Used CIDR for 4 and 5 days, new CIDR for 4 and 5 days (n=5 in each treatment). All cows received a pre synchronization with prostaglandin F_{2α} (PGF) and GnRH. On Day 10 of the estrous cycle started the follicle stimulating hormone (FSH) treatment in nine decreasing doses for 4.5 days. Two applications of PGF were also used along with the 5th and 6th FSH injection. Ovaries were evaluated daily by transrectal ultrasonography to determine the start of the second follicular wave, evaluation of recruitment, follicles growth, also for monitoring the ovulation. Superovulation with used CIDR 4 resulted in a higher ovulation rate between 36-60h after device removal (94.9%, P <0.0001) compared to the control group (49.5%), used CIDR 5 (68.3%), new CIDR 4 (52.8%), or new CIDR 5 (70.6%). Thus, artificial insemination could be performed within 24-36h after removal the used 4 days CIDR. The number of follicles in control cows (38 ± 9.27) was similar (P=0.739) to used CIDR 4 (31.4 ± 6.8), new CIDR 4 (31 ± 4.6), used CIDR 5 (33.4 ± 8.4), or new CIDR 5 (38.6 ± 10.6). Our finds supported the hypothesis that low levels of exogenous progesterone during superovulation were sufficient to allow pulses of luteinizing hormone to enable ovulation induction.

Keywords: low progesterone, ovulation, superovulation, embryo transfer, dairy cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Processo de crescimento, desvio e dominância de uma onda de crescimento folicular e demonstração do perfil de concentração do FSH e diâmetro dos folículos pelo número de dias do ciclo (Adaptado de Ginther, 1997).....	11
Figura 2 -	Ciclo estral bovino apresentando duas ondas de crescimento folicular (Arquivo pessoal).....	12
Figura 3 -	Processo de divergência folicular de uma onda de crescimento folicular (Adaptado de Ginther, 1997).....	14
Figura 4 -	Imagem ultrassonográfica do desenvolvimento folicular ovariano de uma vaca tratada com FSH no decorrer dos 5 dias de protocolo de superovulação e 7 dias após o tratamento.....	19

CAPÍTULO I

Figura 1 -	Esquema dos protocolos utilizados no estudo.....	35
Figura 2 -	Percentual de folículos ovulados (OV) de vacas holandesas com produção média de leite de 40kg/dia tratadas com CIDR usado 4, CIDR novo 4, CIDR usado 5, ou CIDR novo 5 ($P = 0.7798$).....	36
Figura 3 -	Distribuição do percentual de folículos ovulados em vacas da raça holandesa com produção média de leite de 40kg/dia em função do tempo (h) após a primeira aplicação intramuscular de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no grupo de fêmeas Controle (não tratadas), tratadas com CIDR usado 4, CIDR Novo 4, CIDR Usado 5, ou CIDR Novo 5.....	37

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	09
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Ciclo estral e dinâmica folicular em bovinos.....	11
2.1.1. Recrutamento.....	12
2.1.2. Seleção.....	13
2.1.3. Dominância.....	14
2.1.4. Ovulação.....	15
2.2. Controle da dinâmica folicular para a superovulação.....	15
2.3. Técnica de superovulação.....	17
2.4. Preparações hormonais para a superovulação.....	20
2.5. Progesterona exógena no protocolo de superovulação.....	21
2.6. Fatores que afetam a resposta superovulatória.....	22
3 – CAPÍTULO I: MANUSCRITO.....	23
3.1. Resumo.....	24
3.2. Introdução.....	26
3.3. Material e métodos.....	28
3.4. Resultados.....	30
3.5. Discussão.....	31
3.6. Conclusão.....	32
3.7. Referências.....	33
4 – CONCLUSÕES	38
5 – REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O constante desenvolvimento dos rebanhos comerciais e da indústria leiteira impõe desafios nas atividades de manejo e cuidados das vacas em lactação, pois vários fatores contribuem para a reduzida eficiência reprodutiva de grandes rebanhos (LUCY, 2001). Para melhorar e aumentar a produção dos animais em rebanhos comerciais, a transferência de embriões (TE) é a técnica mais empregada, pois multiplica animais de alto valor genético (BÓ et al., 2002; CHEBEL et al., 2008). Mesmo existindo um decréscimo reconhecido na concepção dos rebanhos leiteiros nos últimos 30 anos (LUCY, 2001), o número médio de embriões coletados continua imprevisível e inconsistente pela superovulação em bovinos (MAPLETOFT et al., 2002). Adicionalmente, a média de embriões transferíveis de vacas reprodutivamente saudáveis manteve-se inalterado tanto para vacas leiteiras (HASLER, et al., 1983) quanto para vacas de corte (LOONEY, 1986), mantendo a média de 6,4 e 6,2 embriões, respectivamente (LUCY, 2001). Uma análise conduzida por Hasler (2006), sobre a média de embriões recuperados após coleta em quatro programas comerciais diferentes, não revelou alterações durante o período de 20 anos.

O desenvolvimento de formas eficientes de colheita, fertilização, cultivo e TE apresenta vantagens potenciais, pois as referidas biotécnicas possibilitam diminuir o intervalo de geração, produzir fêmeas com teste de progênie, utilizar fêmeas superiores como doadoras, aumentar o número de descendentes por fêmea atr de nascimentos múltiplos controlados e transportar embriões com genética selecionada para lugares distantes (FOOTE & ONUMA, 1970).

As tentativas para aumentar a taxa de ovulação e o número de embriões viáveis, utilizando diferentes preparações hormonais e tratamentos, foram conduzidas em vários estudos (ARMSTRONG, 1993; MAPLETOFT et al., 2002). A sincronização da emergência folicular é uma alternativa para iniciar a superovulação com reduzida influência da variação na resposta superovulatória (MAPLETOFT, 2002; NASSER et al., 2011). Adicionalmente, há carência de estudos que abordam o uso de diferentes concentrações de progesterona endógena nos tratamentos superovulatórios, resposta ovulatória e qualidade dos embriões, e neste sentido fundamenta-se as atividades propostas desta pesquisa (KAFI & MCGOWAN, 2012).

Portanto, a melhor compreensão do processo de crescimento folicular permite o desenvolvimento de tratamentos eficazes para melhorar a resposta superovulatória em vacas leiteiras submetidas à TE (SEIDEL, 1984; BÓ et al., 2002).

Nossa hipótese é que baixo nível de progesterona exógena durante o tratamento com FSH irá permitir pulsos de LH suficientes para induzir a ovulação em curto espaço de tempo. O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência de protocolos de superovulação com alta e baixa concentração de progesterona sobre o número de folículos ovulados em menor intervalo de tempo e aumento da taxa de ovulação em vacas leiteiras.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo estral e dinâmica folicular

O ciclo estral bovino é dividido em fase folicular e fase luteínica. A primeira inicia com a regressão do corpo lúteo e estende-se até a ovulação. Já a fase luteínica compreende o período de atividade do corpo lúteo (CL) e produção de progesterona (HAFEZ, 2005).

A emergência da onda folicular é definida como o recrutamento simultâneo de folículos de 4 a 5 mm de diâmetro, seguido pela seleção, dominância e atresia dos folículos subordinados (Figura 1).

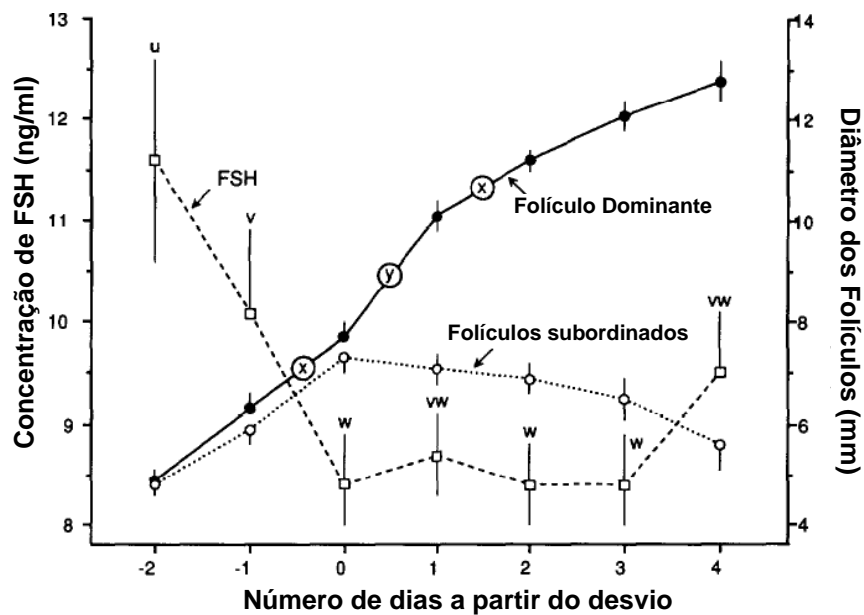


Figura 1 – Processo de crescimento, desvio e dominância de uma onda de crescimento folicular e demonstração do perfil de concentração do FSH e diâmetro dos folículos pelo número de dias do ciclo (Adaptado de Ginther, 1997).

Contudo, o ciclo estral da vaca pode apresentar, na maioria dos casos, 2 ou 3 ondas foliculares. A emergência da onda é iniciada no Dia 0 (dia da ovulação) e, aproximadamente, no Dia 10, em ciclos de duas ondas foliculares (GINTHER et al., 1989) (Figura 2), e em ciclo de três ondas a emergência ocorre no Dia 0 e, aproximadamente, nos dias 8 e 15 (MAPLETOFT, 2002). Porém, somente a última onda de crescimento folicular resultará em ovulação (AERTS & BOLS, 2010), sendo que o destino de 99,9% dos folículos primordiais é a atresia (MORITA & TILLY, 1999).

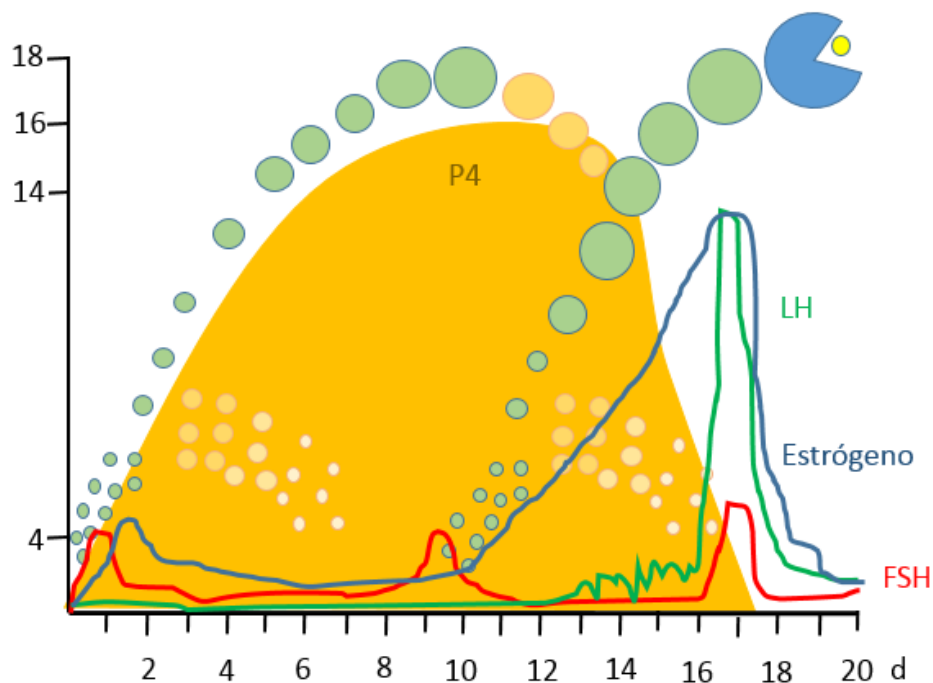


Figura 2 – Ciclo estral bovino apresentando duas ondas de crescimento folicular (Arquivo pessoal).

2.1.1 – Recrutamento

A regressão do Folículo Dominante (FD) durante uma onda folicular ou a ovulação no final de um ciclo estral gera uma elevação transitória de hormônio folículo estimulante (FSH) circulante. Isto ocorre devido à diminuição dos níveis de

estrógeno e inibina sintetizados pelo folículo que, por um mecanismo de retroalimentação (feedback) negativa, atuam no aumento temporário de secreção de FSH pela hipófise. O FSH atua como um fator de sobrevivência precoce dos folículos antrais, e é nesta fase que a maioria dos folículos, sob condições fisiológicas, entram em atresia (CHUN et al., 1996). Portanto, o FSH é o principal responsável pelo recrutamento de um novo grupo de folículos antrais que iniciarão a próxima onda (AERTS & BOLS, 2010).

2.1.2 – Seleção

Após o recrutamento, os folículos são submetidos ao processo de seleção. Geralmente, neste processo um folículo atingirá a dominância e se tornará o FD, enquanto os demais regridem (GINTHER et al., 2000; AERTS & BOLS, 2010). O aumento transitório dos níveis de FSH é responsável pelo início do desenvolvimento de folículos de aproximadamente 4-5mm e após os níveis diminuem (KULICK et al., 1999). Adicionalmente, a produção e secreção de estradiol e inibina pelos folículos em crescimento resulta em supressão da liberação de FSH, embora estes folículos ainda dependam de FSH para o seu desenvolvimento (GIBBONS et al., 1999). O decréscimo dos níveis de FSH basais resultará em seleção de um folículo que apresenta a capacidade de se desenvolver em baixos níveis de FSH circulante e evitar o desenvolvimento de um novo grupo de folículos. Esta capacidade é atribuída a uma transição da dependência do FSH para o hormônio luteinizante (LH). Os receptores de LH surgem quando o folículo atinge aproximadamente 8mm de diâmetro (MIHM et al., 2006). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é responsável pela proliferação celular, sensibilização das células do folículo ao FSH e LH e a esteroidogênese. Considerando que o folículo dominante possui maior concentração de IGF-I livre, conseqüentemente maior biodisponibilidade de receptores de FSH, o FD apresenta maior ação das gonadotropinas para estimulação do crescimento e diferenciação folicular, resultando na dominância (RIVERA & FORTUNE, 2001).

2.1.3 – Dominância

Quando o maior folículo da onda atinge um diâmetro de aproximadamente 8,5mm ocorre a diferenciação entre o futuro FD e os folículos subordinados (Figura 3). Este momento foi definido por Ginther et al. (1997) como “desvio”, ao realizarem a pesquisa no qual o maior folículo da onda foi aspirado antes do desvio, resultando em dominância do segundo maior folículo. Portanto, antes do desvio folicular os folículos de maior diâmetro poderiam se tornar o FD. Os mecanismos exatos para a seleção e desvio ainda devem ser elucidados (AERTS & BOLS, 2010).

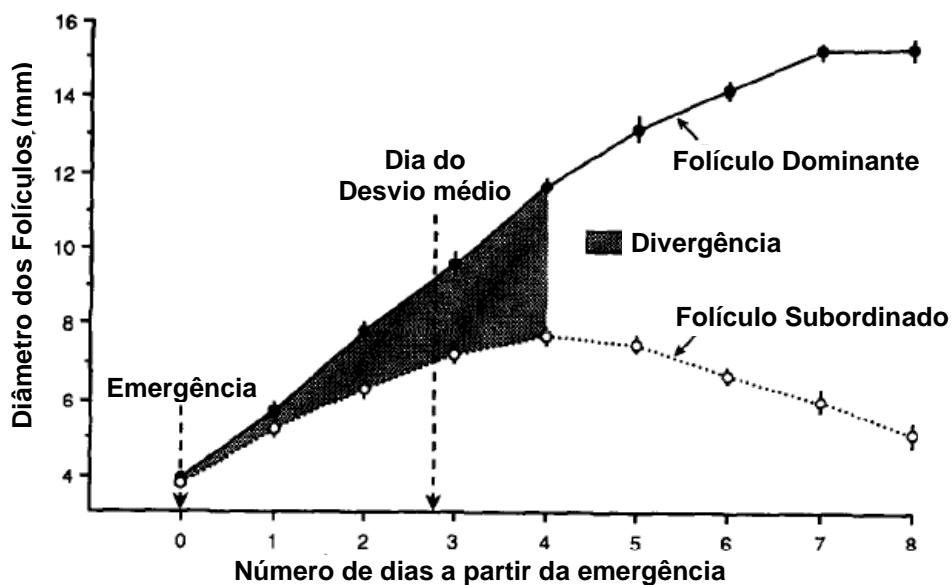


Figura 3 – Processo de divergência folicular de uma onda de crescimento folicular (Adaptado de Ginther, 1997).

O efeito do GnRH é determinado pela sua frequência de pulsos: frequências rápidas promovem liberação de LH e frequências lentas promovem a liberação de FSH (WILDT et al., 1981; NICOL et al., 2008). Em contrapartida, a progesterona de forma aguda inibe a frequência dos pulsos de GnRH (BERGFELD et al., 1996; MCCARTNEY et al., 2007). Já o estradiol pode exercer tanto feedback negativo quanto positivo sobre a secreção de gonadotrofinas; quando sua concentração está

abaixo do limiar das concentrações plasmáticas é negativo e quando está acima do limite é positivo (WILTBANK et al., 2002), resultando em elevada secreção de LH. O pico de LH induz a ovulação e luteinização, na ausência de um CL funcional. Por outro lado, a síntese de estradiol também é influenciada por LH e FSH, pois a produção de receptores de andrógenos nas células da teca é estimulada pelo LH (FORTUNE, 1994). No entanto, a produção de estradiol não parece ser fundamental no mecanismo de seleção do folículo, pois as concentrações variam de acordo com o estado fisiológico da vaca (DRIANCOURT, 2001).

2.1.4 – Ovulação

Os pulsos de LH pré-ovulatório são importantes no processo de maturação e ovulação do folículo. Em resposta ao pico de LH na metade do ciclo estral, as prostaglandinas da série E, produzidas pelos folículos, atuam na ruptura do folículo e na liberação de oócitos (FILION et al., 2001). Além disso, presume-se que o LH estimula e prepara as células da granulosa e da teca para a luteinização (SMITH et al., 1994). O primeiro FD do ciclo geralmente emerge enquanto o CL está ativo. Este CL produz progesterona que afeta negativamente a frequência de pulsos de LH resultando em atresia do FD que é dependente de LH no meio do ciclo. A luteólise durante a dominância do segundo FD resultará em ovulação. Porém, se o CL permanecer ativo, a secreção de progesterona realizará a supressão do LH resultando na regressão da segunda onda. O FD só vai se beneficiar do aumento de frequências de pulso LH na fase folicular, que irá promover a maturação e finalmente, a ovulação (MIHM & AUSTIN, 2002).

2.2. Controle da dinâmica folicular para a superovulação

O intenso progresso observado na manipulação do ciclo estral, na sincronização do desenvolvimento folicular e da ovulação colabora para a rápida difusão de material genético e melhoramento da produção de carne e leite. Portanto,

compreender os fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para otimizar as biotécnicas da reprodução e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2006).

A sincronização da emergência folicular é uma alternativa para iniciar o tratamento superovulatório no intuito de reduzir o efeito da variabilidade da resposta superovulatória (GORDON, 2005; MAPLETOFT, 2006). Os protocolos comumente utilizados para sincronizar a emergência da nova onda folicular na América do Sul empregam estradiol (E₂) e progesterona/progestágenos (P₄) (BÓ et al., 1995; MAPLETOFT et al., 2002). O estradiol tem a função de suprimir a liberação de FSH e induzir a atresia folicular. Nestes protocolos, a nova onda emerge aproximadamente 4 dias após o início do tratamento com E₂ e P₄ e coincide com o primeiro dia de tratamento com FSH na superovulação (BÓ et al., 1995; MAPLETOFT & BÓ, 2012). Porém, o uso de estradiol é proibido em muitos países (LANE et al., 2008), como nos Estados Unidos da América, estimulando assim a busca por alternativas. Uma possibilidade é o uso do GnRH. Neste caso, a emergência da nova onda ocorrerá um a dois dias após o procedimento (PURSLEY et al., 1995; BERGFELT et al., 1994). Porém, apenas 44-54% das vacas leiteiras ovulam quando sincronizadas com GnRH em estágios aleatórios do ciclo estral (BELLO et al., 2006).

O uso de dispositivos intravaginais de progesterona representa uma ferramenta para controle do ciclo estral, especialmente quando usado em conjunto com estrógenos. Vários dos primeiros trabalhos nessa área demonstraram claramente que o dispositivo liberador de progesterona associado ao estrogênio pode ser eficazmente utilizado para iniciar um programa de superovulação (BÓ, 1994). A incorporação de um dispositivo de progesterona no protocolo evita que a doadora manifeste cio mais cedo. Em todos os casos, a inseminação artificial (IA) é realizada normalmente de 12 e 24h após o início do estro (MAPLETOFT et al., 2002).

No intuito de controlar a emergência da onda folicular também pode-se utilizar o método mecânico, isto é, realização da aspiração do FD (BERGFELT et al., 1994; MARTINEZ, 1999), realizada via transvaginal guiada por ultrassonografia. Estudos anteriores sugerem que um folículo dominante modifica adversamente o recrutamento folicular, sendo que a superovulação é prejudicada quando as

aplicações de FSH são iniciadas na presença de um FD (ROUILLIER et al., 1996; WERHMAN et al., 1996). Porém, Stock et al. (1996) demonstraram que um FD não afeta o recrutamento folicular em resposta ao FSH, mas pode ocorrer a ovulação do folículo dominante durante o tratamento.

Segundo Adams et al. (1994), tanto os folículos da primeira onda folicular quanto os da segunda onda folicular são capazes de responder ao tratamento superestimulatório em novilhas. Adicionalmente, a melhor resposta superovulatória ocorre quando o tratamento é iniciado no dia anterior, ou no momento da emergência de uma nova onda folicular (NASSER et al., 1993; ADAMS, 1994; BÓ et al., 1995). Em decorrência do tempo de surgimento da primeira onda (dia da ovulação) e equivalência para iniciar a superovulação, o uso da primeira onda, em vez de ondas foliculares subsequentes pode ser mais conveniente em programas de superovulação, pois esta atividade demanda tempo inferior de tratamento, sendo que o dia do estro pode ser utilizado como um ponto de referência consistente para o início do tratamento (ADAMS et al., 1994). Embora existam protocolos para controle do surgimento de uma onda folicular e ovulação não houve a eliminação da variabilidade na resposta superovulatória. Porém, a aplicação dos mesmos apresentou um impacto positivo ao permitir o início de tratamentos em um tempo pontual (BÓ et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2006).

2.3. Técnica de superovulação

Com o uso da ultrassonografia transretal para estudo da fisiologia ovariana foi possível estabelecer o padrão de desenvolvimento das ondas foliculares em diversas espécies de mamíferos (ADAMS, 1999). Com o advento desta técnica foi possível uma melhor compreensão do processo de crescimento folicular permitindo o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes no intuito de melhorar a resposta superovulatória de fêmeas bovinas submetidas a protocolos de superovulação (SEIDEL, 1981; SEIDEL, 1984; BÓ et al., 2002), podendo, por exemplo, observar que a aplicação do FSH no momento da emergência da onda folicular resulta em elevada resposta superovulatória (NASSER et al., 1993).

Em um sentido amplo, o processo de TE é constituído de uma sequência de etapas, incluído a superovulação e a colheita dos embriões, com o objetivo de transferir os embriões de uma fêmea doadora saudável com genética superior para fêmeas também saudáveis, como receptoras. O principal objetivo da TE é o aumento da taxa de reprodução de vacas de alto valor genético, pois uma fêmea pode gerar vários bezerros ao ano com o uso desta técnica (SEIDEL, 1981). Após a superovulação, o número de embriões coletados é altamente correlacionado, como esperado, com o número de ovulações mensuradas a partir da contagem de corpos lúteos existentes nos ovários (MONNIAUX et al., 1983). A superestimulação depende diretamente do número, distribuição e tamanho das populações de folículos antrais (DONALDSON, 1984). Assim, a produção de embriões é dependente da ovulação de um grupo de folículos superestimulados.

Os primeiros trabalhos com programas superovulatórios surgiram com Lester Earl Casida, renomado pesquisador americano, e seus colaboradores, em 1943. A superovulação é o elemento-chave da TE em bovinos, porém poucas alterações ocorreram no modo de como a superovulação é praticada (ARMSTRONG, 1993). O princípio básico da técnica é estimular o desenvolvimento folicular pela administração intramuscular ou subcutânea de hormônio folículo-estimulante (FSH) com o objetivo de aumentar o número de oócitos (Figura 4) ou embriões coletados por doadora (FOOTE & ONUMA, 1970). Tradicionalmente, a superestimulação folicular em bovinos foi iniciada no meio do ciclo estral, isto é, do oitavo ao décimo segundo dia do ciclo estral, coincidindo com o período da segunda onda do ciclo em que os folículos antrais estão sendo recrutados (DONALDSON, 1984; BÓ, 2002). Esta abordagem foi bastante confiável e o número de embriões viáveis e transferíveis não variaram quando o tratamento superestimulatório com FSH-P foi iniciado entre os dias 9 a 13 do ciclo estral das doadoras, mantendo uma média de 6 embriões (DONALDSON, 1984). No entanto, a necessidade de estabelecer a data do último cio da doadora torna-se uma desvantagem deste protocolo. Porém, com o uso da ultrassonografia pode-se monitorar o ciclo estral e o crescimento das ondas foliculares minimizando esta desvantagem. Adicionalmente, o estabelecimento do controle do desenvolvimento folicular e da ovulação, permite o início do tratamento superestimulatório em um determinado momento do ciclo estral (BÓ et al., 2002), como por exemplo, na emergência folicular (NASSER et al., 2011). Segundo Adams

et al. (1994), os folículos na primeira onda são tão sensíveis ao tratamento com gonadotrofina quanto os folículos da segunda onda. Entretanto, poucos artigos científicos foram publicados para a compreensão da dinâmica do crescimento folicular antes, durante e após o período de superestimulação (KAFI & MCGOWAN, 2012).

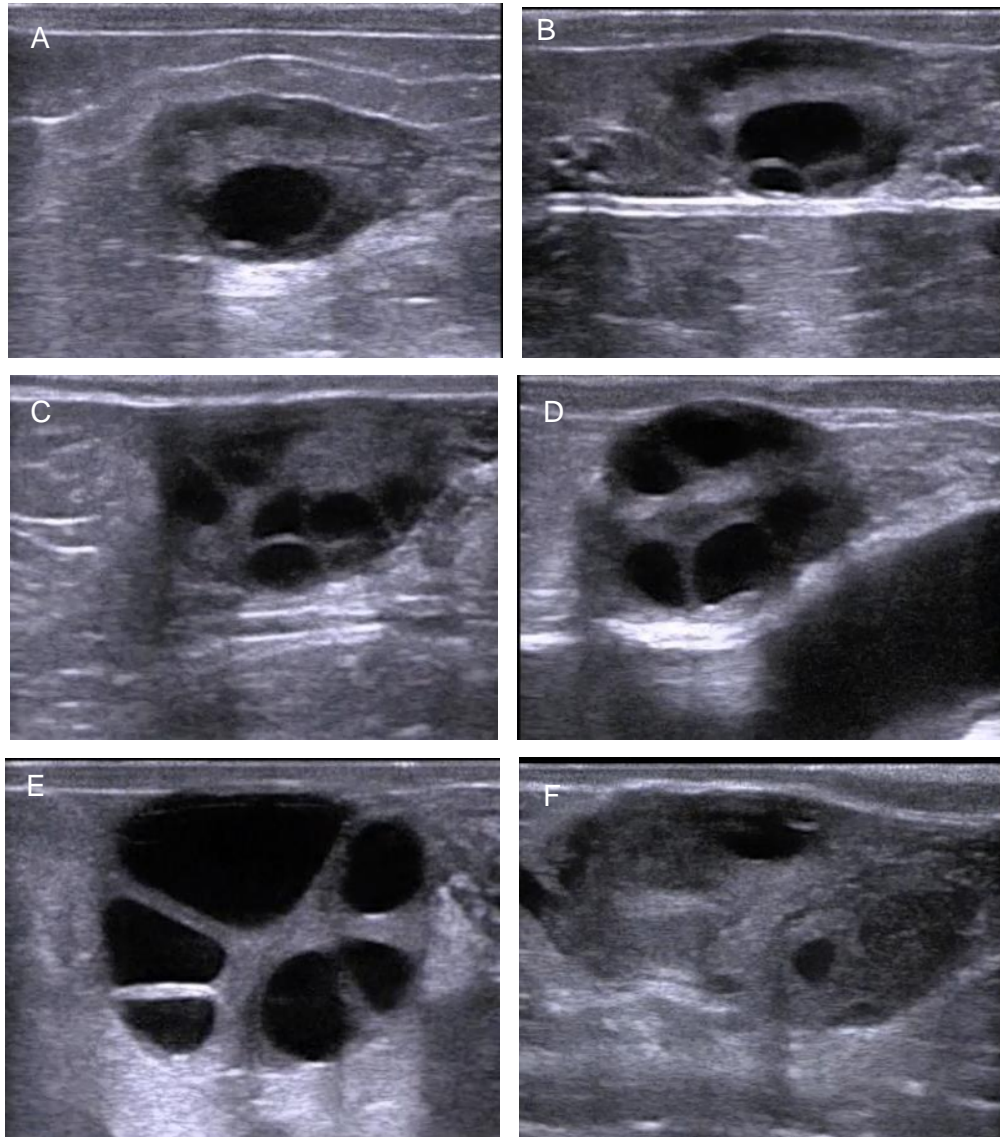


Figura 4 – Imagem ultrassonográfica do desenvolvimento folicular ovariano de uma vaca tratada com FSH no decorrer dos 5 dias de protocolo de superovulação e 7 dias após o tratamento. A- Ovário no primeiro dia de protocolo. B- Ovário no segundo dia de protocolo. C- Ovário no terceiro dia de protocolo. D- Ovário no quarto dia de protocolo. E- Ovário no quinto e último dia de suplementação com FSH. F- Ovário com corpos lúteos sete dias da superovulação (Arquivo pessoal).

2.4. Preparações hormonais para a superovulação

Para contornar as limitações fisiológicas de uma ovulação por ciclo estral em bovinos, a dinâmica folicular pode ser modulada por administração exógena de gonadotrofinas. Nos programas de coleta e TE é usual a utilização de gonadotrofinas específicas para promover múltiplas ovulações na vaca doadora (AERTS & BOLS, 2010). A superestimulação ovariana em bovinos pode ser realizada com gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou hormônio folículo estimulante (FSH), principalmente. Estas gonadotrofinas exógenas diferem em percentual de FSH/LH e tempo da meia-vida (MAPLETOFT et al., 2002).

A eCG é uma glicoproteína complexa com atividade nos receptores de FSH e LH que tem por característica meia-vida longa, mais de 40 horas, o que representa uma vantagem prática, visto que apenas uma administração induzirá a superestimulação ovariana (MURPHY & MARTINUK, 1991). No entanto, pode ocorrer a hiperestimulação do ovário resultando em anovulação e perfis endócrinos anormais (MOOR et al., 1984). Para evitar a hiperestimulação, anticorpos contra eCG (anti-PMSG) podem ser administrados na inseminação artificial (DIELEMAN et al., 1993).

Por outro lado, a meia-vida do FSH é muito curta na vaca (5 horas) necessitando aplicações frequentes para induzir a superovulação (MONNIAUX et al., 1983). Com isto, os tratamentos preconizados indicam duas aplicações diárias de FSH, pois resulta em maior resposta à superovulação do que apenas uma administração ao dia (LOONEY et al., 1981; MONNIAUX et al., 1983). Muitos profissionais utilizam doses decrescentes de FSH e administram $\text{PGF}_{2\alpha}$ no terceiro dia do protocolo de superovulação para induzir a luteólise e promover a ovulação e estro. Já outros preferem tratar vacas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ no quarto dia, e muitos não administram o FSH no dia após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Independentemente disso, os protocolos têm induzido com sucesso a superovulação (MAPLETOFT & BÓ, 2012).

2.5. Progesterona exógena no protocolo de superovulação

A progesterona pode afetar a qualidade do oócito através do seu efeito no desenvolvimento do folículo dominante. Concentrações circulantes de P4 durante o ciclo estral regulam a secreção do GnRH, que por sua vez regula a frequência dos pulsos de LH (FAIR & LONERGAN, 2012). O meio hormonal em que folículos crescem difere muito entre a primeira e segunda onda de desenvolvimento folicular. Os folículos da primeira onda desenvolvem-se sob baixas concentrações sistêmicas de P4 devido à presença de um CL em crescimento.

A pesquisa de Pfeifer et al. (2009) revelou que oócitos recuperados de vacas *Bos taurus taurus x Bos taurus indicus* com baixa concentração de progesterona plasmática apresentam melhor qualidade e resultam em maior número de embriões quando comparadas com doadoras que apresentavam maior concentração de progesterona plasmática advindas de uma fonte exógena de progesterona. Estes autores concluíram que a supressão dos pulsos de LH num ambiente de alta progesterona é responsável pelos efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento dos oócitos e o crescimento folicular.

Em contrapartida, Nasser et al. (2011) relataram que a suplementação com progesterona exógena na emergência da primeira onda folicular melhora a qualidade embrionária durante o tratamento superestimulatório em vacas Nelore. Dados semelhantes foram demonstrados por Rivera et al. (2011), pois a superovulação na primeira onda de crescimento folicular associada ao ambiente de baixa concentração de progesterona resultou em menor qualidade de oócitos e de embriões em comparação às vacas superovuladas em ambiente com alta progesterona. A alta progesterona, tanto na primeira onda de crescimento folicular induzida por progestágenos quanto na segunda onda de crescimento folicular permitiu a produção de oócitos de melhor qualidade para fertilização e posterior desenvolvimento embrionário em vacas holandesas em lactação. O efeito da P4 elevada durante o crescimento do folículo ovulatório tem sido objeto de estudos por outros grupos de pesquisa (BISINOTTO & SANTOS, 2011; WILTBANK et al., 2011).

2.6. Fatores que afetam a resposta superovulatória

O sucesso da superovulação é influenciado por muitos fatores. Aqueles fatores relacionados à doadora que são raça, idade, paridade e histórico reprodutivo devem ser adicionados aos relacionados ao manuseio da preparação hormonal de FSH, protocolo de superovulação, clima e nutrição. Além disso, a qualidade do sêmen, momento da inseminação artificial e habilidade do inseminador (HASLER, 2014). A superovulação nas doadoras é realizada pela administração de preparações hormonais gonadotrópicas cujas respostas superovulatórias apresentam ampla variabilidade, tanto na taxa de ovulação quanto na produção de embriões viáveis. A imprevisibilidade desta resposta provoca graves problemas logísticos que contribuem para o elevado custo da produção de embriões em programas convencionais de TE (ARMSTRONG, 1993).

3 CAPITULO I

MANUSCRITO

Os resultados dessa dissertação são apresentados na forma de manuscrito, de acordo com as normas ao qual esse será submetido:

Dispositivo intravaginal de progesterona novo e usado na superovulação de vacas leiteiras

Ana Paula Martini, Gilson Antonio Pessoa, João Paulo N. Martins, Dongliang Wang,
Nanheng Mu, James R. Pursley e Mara I. B. Rubin.

1 **Dispositivo intravaginal de progesterona novo e usado na superovulação de vacas**
2 **leiteiras**

3 **Superovulation of dairy cattle using new or used intravaginal progesterone device**

4

5 **Ana Paula Martini¹, Gilson Antonio Pessoa², João Paulo N. Martins³, Dongliang Wang³,**
6 **Nanheng Mu³, James R. Pursley³ e Mara I. B. Rubin^{1,2*}.**

7

8

9 **RESUMO**

10

11 Protocolos de superovulação com diferentes concentrações de progesterona foram
12 avaliados sobre o percentual de folículos ovulados em vacas leiteiras de alta produção. Vinte e
13 cinco fêmeas foram distribuídas em grupo controle (não tratadas; n=5) e quatro tratamentos
14 com uso de dispositivos intravaginais de progesterona (CIDR): CIDR novo ou usado, por 4 ou
15 5 dias (n=5 em cada tratamento). Todas as vacas receberam prostaglandina F₂α (PGF) e
16 GnRH via IM. No Dia 10 (D10) do ciclo estral iniciou o tratamento com hormônio folículo
17 estimulante (FSH) em 9 doses decrescentes, por 4,5 dias. Concomitante com a 5^a e 6^a
18 aplicação de FSH as vacas receberam PGF. Os ovários foram avaliados diariamente por
19 ultrassonografia transretal para determinar o início da segunda onda folicular, o recrutamento
20 e crescimento dos folículos, bem como o monitoramento das ovulações. O CIDR usado por 4
21 dias resultou em maior percentual de folículos ovulados entre 36 e 60h após a remoção do

¹ Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal De Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, 97.105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS 90.040-060, Brasil.

*Autor para correspondência: mararubin90@yahoo.com.br

³Department of animal science, Michigan State University, Anthony Hall, Shaw Lane 474, East Lansing, MI 4882-1225, Estados Unidos.

1 dispositivo (94,9%; $P < 0.0001$) comparado ao controle (49,5%) e tratamentos: CIDR usado 5
2 (68,3%), CIDR novo 4 (52,8%) e CIDR novo 5 (70,6%). A inseminação artificial deste
3 protocolo é recomendada entre 24 a 36h após a retirada do CIDR usado por 4 dias. O número
4 de folículos das vacas controle ($38 \pm 9,27$), CIDR usado 4 ($31,4 \pm 6,8$), CIDR novo 4 ($31 \pm 4,6$),
5 CIDR usado 5 ($33,4 \pm 8,4$) e CIDR novo 5 ($38,6 \pm 10,6$) foi similar ($P = 0.739$). Confirma-se a
6 hipótese de que baixo nível de progesterona exógena durante o tratamento com FSH permite
7 pulsos de hormônio luteinizante suficientes para indução da ovulação.

8
9 **Palavras-chave:** níveis de progesterona, ovulação, superovulação, transferência de embriões,
10 vacas leiteiras.

11
12 **ABSTRACT**

13
14 The efficiency of superovulation protocols with different levels of progesterone in
15 dairy cows was evaluated on the ovulated follicles rate. Twenty five high producing female
16 were distributed in control group ($n = 5$), and four treatments with progesterone device
17 (CIDR). Used CIDR for 4 and 5 days, new CIDR for 4 and 5 days ($n=5$ in each treatment).
18 All cows received a pre synchronization with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF) and GnRH. On Day 10
19 of the estrous cycle started the follicle stimulating hormone (FSH) treatment in nine
20 decreasing doses for 4.5 days. Two applications of PGF were also used along with the 5th and
21 6th FSH injection. Ovaries were evaluated daily by transrectal ultrasonography to determine
22 the start of the second follicular wave, evaluation of recruitment, follicles growth, also for
23 monitoring the ovulation. Superovulation with used CIDR 4 resulted in a higher ovulation rate
24 between 36-60h after device removal (94.9%, $P < 0.0001$) compared to the control group
25 (49.5%), used CIDR 5 (68.3%), new CIDR 4 (52.8%), or new CIDR 5 (70.6%). Thus,

1 artificial insemination could be performed within 24-36h after removal the used 4 days CIDR.
2 The number of follicles in control cows (38 ± 9.27) was similar ($P=0.739$) to used CIDR 4
3 (31.4 ± 6.8), new CIDR 4 (31 ± 4.6), used CIDR 5 (33.4 ± 8.4), or new CIDR 5 (38.6 ± 10.6).
4 Our finds supported the hypothesis that low levels of exogenous progesterone during
5 superovulation were sufficient to allow pulses of luteinizing hormone to enable ovulation
6 induction.

7
8 **Key words:** low progesterone, ovulation, superovulation, embryo transfer, dairy cattle.

9 10 11 **INTRODUÇÃO**

12
13 A onda de crescimento folicular é o desenvolvimento simultâneo de muitos folículos
14 ovarianos com diâmetro entre 4-5mm, seguido pela seleção, crescimento do folículo
15 dominante e supressão dos subordinados. Na vaca, o ciclo estral pode apresentar duas ou três
16 ondas de crescimento, sendo o surgimento da onda no dia da ovulação (Dia 0) e também no
17 décimo dia em vacas com duas ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989).
18 Tradicionalmente, a superestimulação folicular em bovinos tem seu início na segunda onda do
19 ciclo estral, ou seja, 8^o a 12^o dia do ciclo estral, coincidindo com o período de recrutamento
20 dos folículos antrais (DONALDSON, 1984).

21 A base da superovulação é estimular o desenvolvimento folicular pela administração de
22 hormônio folículo-estimulante (FSH) com o objetivo de obter grande número de embriões
23 viáveis em programas de transferência de embriões bovinos (FOOTE & UNUMA, 1970;
24 ARMSTRONG, 1993). No entanto, a resposta superovulatória ainda promove grande
25 variabilidade na taxa de ovulação e produção de embriões viáveis (ARMSTRONG, 1993;

1 MAPLETOFT et al., 2002). O sucesso da superovulação depende de fatores que podem
2 influenciar negativamente o resultado da técnica, como raça, idade, paridade e história
3 reprodutiva. Além dos fatores que estão relacionados à superovulação, o armazenamento dos
4 hormônios, clima, nutrição e qualidade do sêmen também influenciam na resposta
5 superovulatória (MAPLETOFT et al., 2002; HASLER, 2014).

6 As tentativas para aumentar a taxa de ovulação e o número de embriões viáveis,
7 utilizando diferentes preparações hormonais e tratamentos, foram conduzidas em vários
8 estudos (ARMSTRONG, 1993; MAPLETOFT et al., 2002). A sincronização da emergência
9 folicular é uma alternativa para iniciar a superovulação com reduzida influência da variação
10 na superovulação (MAPLETOFT, 2002). Adicionalmente, a superovulação é melhor quando
11 o tratamento é iniciado no dia, ou antes do início de uma nova onda folicular (NASSER, et al.
12 1993).

13 Existem poucas informações sobre a relação entre diferentes concentrações de
14 progesterona nos tratamentos superovulatórios, resposta ovulatória e qualidade dos embriões
15 (KAFI & MCGOWAN, 2012). Portanto, uma melhor compreensão do processo de
16 crescimento folicular permite o desenvolvimento de tratamentos eficazes para melhorar a
17 resposta superovulatória em vacas leiteiras (SEIDEL, 1984; BÓ et al., 2002). Nossa hipótese é
18 que baixo nível de progesterona exógena durante o tratamento com FSH irá permitir pulsos de
19 LH suficientes para induzir a ovulação em curto espaço de tempo. O objetivo deste estudo foi
20 comparar a eficiência de protocolos de superovulação com alta e baixa concentração de
21 progesterona sobre o número de folículos ovulados em menor intervalo de tempo e aumento
22 da taxa de ovulação em vacas leiteiras.

23

24

25

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 Este estudo foi conduzido de fevereiro a abril de 2014, na Nobis Dairy Farm em St.
4 Johns, Michigan, Estados Unidos da América, com vacas ordenhadas três vezes ao dia e
5 produção média de leite de 40 kg/vaca/dia. Alojadas em galpões free stall, as fêmeas recebiam
6 na alimentação ração completa composta de silagem de milho, grãos de milho e alfafa,
7 formulada para atender as exigências nutricionais de vacas leiteiras (NRC, 2001). Vinte e
8 cinco vacas Holandesas, sadias e cíclicas, foram distribuídas aleatoriamente em grupo
9 controle (não tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P_4 = CIDR®, Pfizer
10 Saúde Animal, New York, NY, USA) e 4 tratamentos (Figura 1). Todas as fêmeas receberam
11 uma pré-sincronização que consistia na aplicação intramuscular de 500mg de prostaglandina
12 $F_{2\alpha}$ (cloprostenol sódico, Estrumate®, Schering-Plough Saúde Animal, União, NJ, EUA) no
13 dia -2 (D -2) e -1 (D -1), seguida da aplicação intramuscular de 100 μ g de um análogo do
14 GnRH (gonadorelina diacetato tetrahidratada, Fertagyl®, Merck Animal Health, Desoto, KS,
15 EUA) no dia zero (D 0), para promover o início de uma nova onda folicular.

16 Para promover a superovulação (SOV) cada fêmea recebeu um total de 400 mg de FSH
17 (NIH-FSH-P, Folltropin ®, Bioniche Life Sciences Inc, Belleville, ON, Canadá) administrado
18 em nove doses decrescentes, via intramuscular, de 12 em 12h, por 4,5 dias. A primeira
19 aplicação de FSH foi efetuada no dia 10 (D10) do ciclo estral, 10 dias após a aplicação do
20 análogo do GnRH. Dispositivos intravaginais de progesterona novos ou usados foram
21 introduzidos concomitantemente à primeira aplicação de FSH, permanecendo por 4 ou 5 dias,
22 de acordo com os seguintes tratamentos: grupo controle (sem CIDR; n = 5), CIDR usado por
23 4 dias (n=5), CIDR novo por 4 dias, CIDR usado por 5 dias (n = 5), ou CIDR novo por 5 dias
24 (n = 5). Os dispositivos de progesterona usados foram utilizados por 7 dias previamente a este
25 estudo, lavados e desinfetados com clorexidine. Os dispositivos usados foram considerados

1 de baixa progesterona enquanto que os dispositivos novos foram considerados de alta
2 progesterona. Uma aplicação intramuscular de 500mg de prostaglandina F₂ α IM foi efetuada
3 para induzir a regressão do corpo lúteo (CL) juntamente com a quinta e sexta administração
4 de FSH (D 12) e, também, 7 dias após a última injeção de FSH.

5 As fêmeas foram submetidas a exame ultrassonográfico (US), via transretal, com uso do
6 aparelho MyLab™ One (Esaote Pie Medical, Genova, Itália) com transdutor de arranjo linear
7 (10 MHz) no D -2 para avaliação dos ovários quanto à presença de corpos lúteos e folículos.
8 No D0 verificou-se a regressão do CL e presença de folículos pré-ovulatórios. Já no D 3
9 avaliou-se a ovulação e regressão do corpo lúteo da onda anterior. Nos dias 7, 8 e 9 o exame
10 ultrassonográfico foi efetuado para monitoramento da segunda onda folicular. O exame de
11 ultrassom foi conduzido uma vez ao dia a partir do D 10 até o D 13 para monitorar o
12 crescimento folicular e duas vezes ao dia, a partir do último dia de tratamento com FSH (D
13 14), por 4 dias para verificar o número de folículos ovulados. Sete dias após o início das
14 ovulações novo exame US foi realizado para contagem do número de CL. Diariamente, os
15 folículos e corpos lúteos foram medidos e os dados registrados em um mapa ovariano
16 individual por vaca.

17 Os dados individuais das variáveis paramétricas (dias em lactação, produção de leite e
18 número de lactações) das unidades experimentais foram submetidos ao teste de normalidade
19 D' Agostino e Pearson e para comparação de médias, o teste Tukey, com nível de
20 significância de 5%. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado nos dados da variável não
21 paramétrica de escore corporal com nível de significância de 5%. As variáveis número de
22 folículos, número e percentual de folículos ovulados foram submetidos à análise de variância
23 utilizando múltiplas comparações pelo do teste de Bonferroni, a nível de significância de 5%,
24 com o programa Graph Pad Prism versão 4.00 para Windows, Graph Pad Software, San
25 Diego, Califórnia.

1 **RESULTADOS**

2

3 A produção de leite, número de lactações e escore de condição corporal tiveram
4 distribuição normal e foram similares ($P > 0,05$) entre o grupo controle e demais grupos. Não
5 houve interferência na resposta superovulatória das doadoras quanto à produção de leite ($P =$
6 $0,92$), número de lactações ($P = 0,85$) e escore de condição corporal ($P = 0,98$).

7 O número médio total de folículos por grupo foi similar ($P = 0,739$) entre as fêmeas do
8 grupo controle ($38,0 \pm 9,27$) e fêmeas tratadas com CIDR usado 4 ($31,4 \pm 6,8$), CIDR novo 4
9 ($31,0 \pm 4,6$), CIDR usado 5 ($33,4 \pm 8,4$) e CIDR novo 5 ($38,6 \pm 10,6$). No entanto, observou-
10 se variação individual ($P = 0,034$) dos animais à resposta superovulatória entre as fêmeas
11 tratadas com CIDR e fêmeas não tratadas (grupo controle), não havendo interferência na
12 homogeneidade dos mesmos. O percentual total de folículos ovulados (Figura 2) foi
13 semelhante ($P = 0,7798$) entre o grupo de fêmeas controle e as fêmeas tratadas com CIDR,
14 independente do tratamento.

15 O percentual de folículos ovulados das fêmeas tratadas após a remoção do CIDR, ou
16 fêmeas não tratadas após a observação de cio no grupo controle está apresentado na Figura 3.
17 A maior concentração de folículos ovulados em período ideal de 24h após a remoção do
18 dispositivo de progesterona foi observado nas fêmeas tratadas com CIDR usado por 4 dias
19 ($94,9\%$, $P < 0,0001$) comparado às vacas do grupo controle ($49,5\%$), tratadas com CIDR
20 usado 5 dias ($68,3\%$), CIDR novo 4 dias ($52,8\%$), ou CIDR novo 5 dias ($70,6\%$).

21

22

23

24

25

1 **DISCUSSÃO**

2 A variabilidade na resposta aos tratamentos hormonais em bovinos são fatores
3 limitantes na aplicação de tecnologias reprodutivas em vacas leiteiras, como a superovulação
4 e a transferência de embriões. Além disso, a superovulação pode ser influenciada pela raça,
5 idade, paridade e histórico reprodutivo da doadora (MAPLETOFT et al., 2002). Uma variável
6 comum às unidades experimentais é o ciclo estral de cada vaca, que pode apresentar duas ou
7 três ondas de crescimento folicular, com isto o início da segunda onda folicular pode variar
8 entre vacas (GINTHER et al., 1989). Assim, a sincronização da emergência folicular antes do
9 início do tratamento superestimulatório é sugerida (GORDON, 2005). Neste estudo, as vacas
10 foram pré-sincronizadas com prostaglandina $F_2 \alpha$ no D -2 e D -1 e com o análogo do GnRH
11 no D 0. A confirmação da nova onda folicular ocorreu no D 3 com o exame ultrassonográfico
12 e posteriormente, no D 7, D 8 e D 9 para a confirmação de que a emergência folicular da
13 segunda onda iniciaria no D 10, coincidindo com o primeiro dia de aplicação do FSH.

14 O FSH é a gonadotrofina comumente empregada na superovulação de fêmeas bovinas
15 que consiste na aplicação de 2 doses diárias com intervalo de 12h, pelo período de 4 ou 5 dias
16 (LOONEY et al., 1981), sendo a primeira aplicação entre os dias 9 a 13 do ciclo estral
17 (DONALDSON, 1984) em protocolos em que não se utiliza estrógenos. Adicionalmente, a
18 progesterona exógena também pode ser utilizada no auxílio aos tratamentos superovulatórios
19 em doadoras, porém o seu uso gerou resultados discordantes. MOOR et al. (1984) relataram
20 que baixas concentrações séricas de progesterona resultam em perfis aberrantes de LH, que
21 podem interferir na maturação do oócito, ovulação e luteinização do corpo lúteo. Isto pode
22 ocorrer pelo fato da progesterona exercer um feedback negativo sobre a pulsatilidade de LH,
23 resultando em diminuição do crescimento e esteroidogênese dos folículos (EVANS et al.,
24 1997). Neste estudo, o grupo controle, cujas fêmeas não foram tratadas com progesterona
25 exógena (CIDR) apresentou distribuição irregular do percentual de folículos ovulados em

1 função do tempo, após a aplicação de $\text{PGF}_2 \alpha$ no D 12 em comparação com as fêmeas dos
2 outros quatro tratamentos. Isto pode ser explicado pela insuficiente concentração de P_4 e a
3 incapacidade em regular a pulsatilidade de LH.

4 Usualmente, 48 a 72h após o início do tratamento superovulatório deve se administrar
5 PGF ou seus análogos (PERRY & DONALDSON, 1984) para regressão completa do corpo
6 lúteo, pois este influencia diretamente na manifestação do estro das vacas doadoras, isto é,
7 apresenta relação positiva com o grau de estimulação ovariana (DONALDSON, 1984). As
8 vacas do grupo controle apresentaram estro 60h após a primeira aplicação de $\text{PGF}_2 \alpha$, já as
9 vacas tratadas com CIDR, o estro variou entre 12 e 36h após a sua remoção. Adicionalmente,
10 espera-se que a maioria das vacas apresentem estro de 24 a 48h após a remoção do CIDR
11 (LEMASTER et al., 1999), seguida pela inseminação artificial (IA) em 12 e 24h após o início
12 do estro (STROUD & HASLER, 2006).

13 O momento da ovulação é um ponto crítico em programas superovulatórios e deve se
14 concentrar até a 24^a hora após a última IA. No nosso estudo, a maior resposta ovulatória em
15 um período ideal de fecundação no grupo CIDR usado por 4 dias reforça a hipótese de que o
16 uso de concentrações baixas de progesterona, advindas de uma fonte exógena, proporciona
17 suficientes pulsos de LH para controlar a ovulação e também influencia no maior número de
18 folículos ovulados em menor intervalo de tempo comparado ao uso de alta e baixa
19 progesterona durante 5 dias ou alta progesterona por 4 dias. Assim, o uso deste protocolo
20 permite indicar que a IA seja realizada no período de 24 a 36h após a retirada do dispositivo
21 com baixa progesterona durante 4 dias, sem o uso de indutor da ovulação.

22

23 **CONCLUSÃO**

24 Os resultados deste estudo confirmam que a superestimulação no início da segunda
25 onda folicular, juntamente com aplicação de dispositivos intravaginais de progesterona de

1 segundo uso, durante quatro dias, em vacas leiteiras, resulta em maior número de folículos
2 ovulados em menor intervalo de tempo das ovulações em 48h após a remoção do dispositivo.
3 Este resultado apoiou a nossa hipótese de que um baixo nível de progesterona exógena
4 durante o tratamento com FSH permite pulsos de LH suficientes para controle do tempo de
5 LH e indução da ovulação.

6 **Agradecimentos** - À Nobis Dairy Farm por conceder os animais e apoio para o experimento
7 sem qualquer ônus. À Empresa Bioniche Life Science Inc. pela doação de FSH.

8

9 **REFERÊNCIAS**

10 ARMSTRONG, D. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7–
11 24, 1993.

12 BÓ, G.A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer
13 programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53–72, 2002.

14 DONALDSON, L.E. The day of estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle.
15 **Theriogenology**, v.22, p.97-99, 1984.

16 EVANS, A.C.O. et al. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse
17 amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during luteal
18 phase in bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.57, p.394–401, 1997.

19 FOOTE, R.H.; ONUMA, H. Superovulation, Ovum Collection, Culture and Transfer. A
20 Review". **Journal of Dairy Science**, v.53, n.2, 1970.

21 GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and Characteristics of Follicular
22 Waves during the Bovine Estrous Cycle. **Animal Reproduction Science**. v.20, p.187-200,
23 1989.

24 GORDON, I.R. **Reproductive Technologies in Farm Animals**. CABI Publishing:
25 Cambridge, USA, 2005.

- 1 HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal
2 *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences.
3 **Theriogenology**, v.81, p.152-169, 2014.
- 4 KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Relationship Between Different Concentrations of the Plasma
5 Progesterone at the Time of FSH-P Treatment and the Superovulatory Response in Holstein
6 Dairy Heifers. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, p.75–78, 2012.
- 7 LEMASTER, J.W. et al. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers
8 treated with an intravaginal progesterone-releasing insert in combination with prostaglandin
9 F₂alpha and estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1860-1868, 1999.
- 10 LOONEY, C. R. et al. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for
11 superovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v.15, p.13–22, 1981.
- 12 MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation
13 in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.601–11, 2002.
- 14 MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to
15 superovulation. **Theriogenology**, v.21, p.103–116, 1984.
- 16 NASSER, L. et al. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in
17 heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713–724, 1993.
- 18 NRC. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. editora Natl. Acad. Sci.,
19 Washington, DC.
- 20 PERRY, B.; DONALDSON, L. The use of cloprostenol, fenprostalen and prostaglandin
21 F₂ alpha in the superovulation of cows. **Theriogenology**, v.21, p.250, 1984.
- 22 SEIDEL, G.E. Applications of Embryo Transfer and Related Technologies to Cattle. **Journal**
23 **of Dairy Science**, n.67, p.2786-2796, 1984.
- 24 STROUD, B.; HASLER, J.F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually
25 work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v.65, p.65–76, 2006.

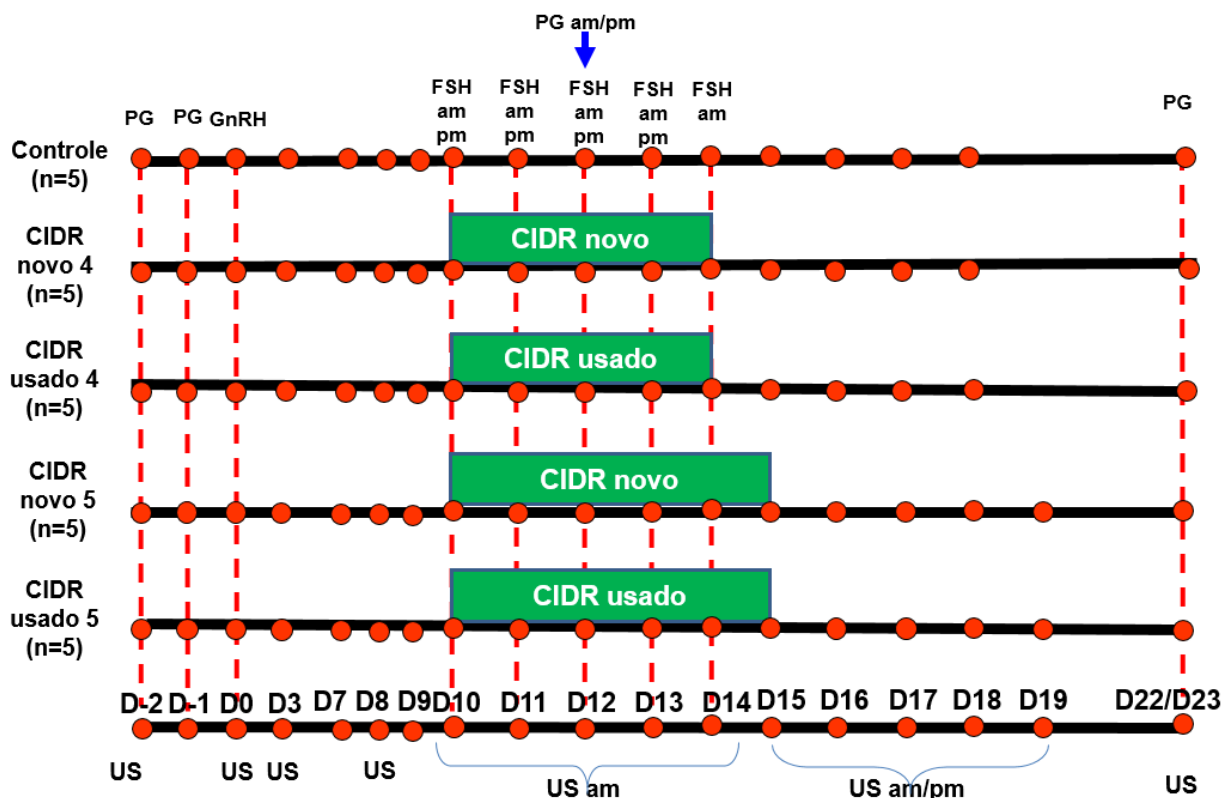
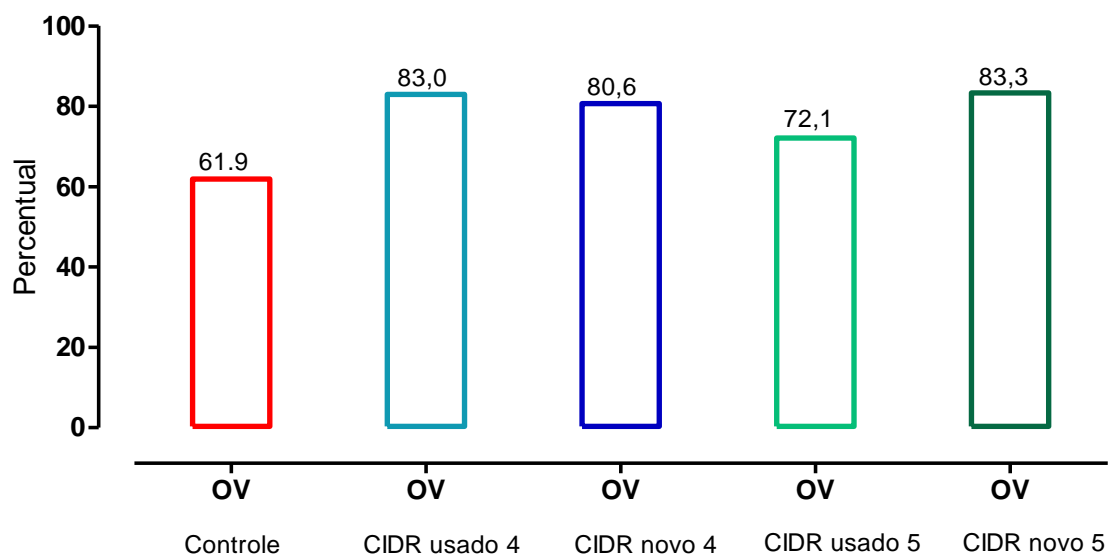


Figura 1. Esquema dos protocolos utilizados no estudo.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15



1

2 Figura 2. Percentual de folículos ovulados (OV) de vacas holandesas com produção média de
3 leite de 40kg/dia tratadas com CIDR usado 4, CIDR novo 4, CIDR usado 5, ou CIDR novo 5
4 (P = 0.7798).

5

6

7

8

9

10

11

12

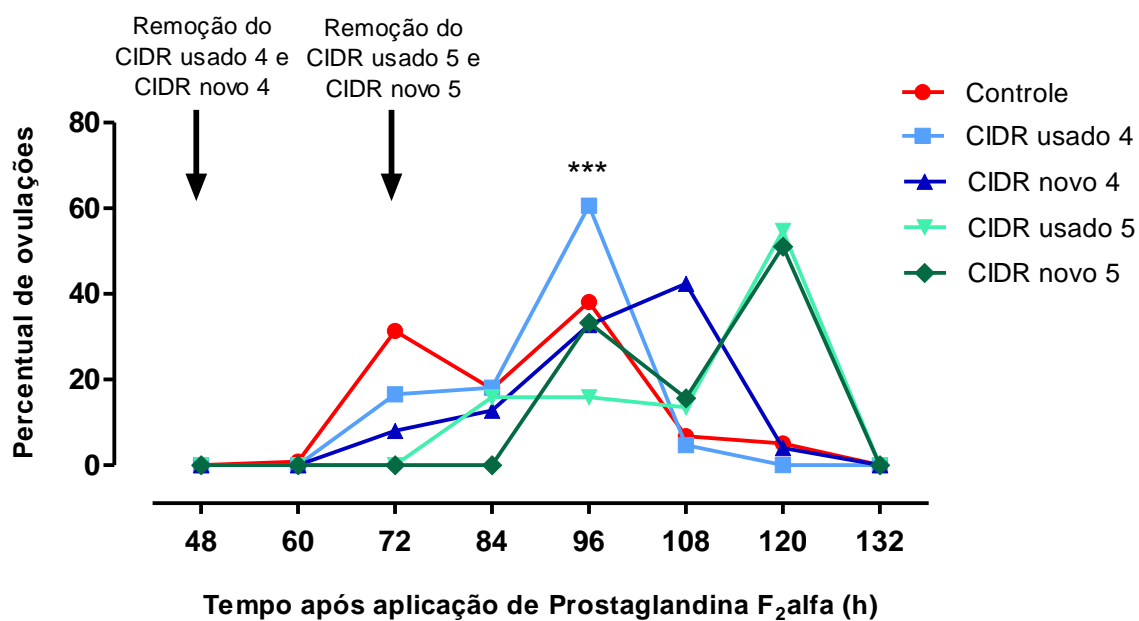
13

14

15

16

17



1

2 Figura 3. Distribuição do percentual de folículos ovulados em vacas da raça holandesa com
 3 produção média de leite de 40kg/dia em função do tempo (h) após a primeira aplicação
 4 intramuscular de prostaglandina F₂ α no grupo de fêmeas Controle (não tratadas), tratadas
 5 com CIDR usado 4 dias, CIDR Novo 4 dias, CIDR Usado 5 dias, ou CIDR Novo 5 dias.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo confirmam que a superestimulação no início da segunda onda folicular juntamente com aplicação de dispositivos intravaginais de progesterona de segundo uso, durante 4 dias em vacas leiteiras, resulta em maior número de folículos ovulados em menor intervalo de tempo das ovulações em 48h após a remoção do dispositivo.

Este resultado apoiou a hipótese de que um baixo nível de progesterona exógena durante o tratamento com FSH permite pulsos de LH suficientes para controle do tempo de LH e indução da ovulação.

5 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. et al. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103–1113, 1994.

ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.17-32, 1999.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180–187, 2010.

ARMSTRONG, D. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7–24, 1993.

BARUSELLI, P.S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.88, p.65-77. 2006.

BELLO, N.M.; STEIBEL, J.P.; PURSLEY, J.R. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3413–3424, 2006.

BERGFELD, E.G. et al. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 betaestradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v.54, p.546–553, 1996.

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

BISINOTTO, R.S; SANTOS, J.E. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.258-266, 2011.

BÓ, G.A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.

BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.32–40, 1995.

BÓ, G.A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53–72, 2002.

CASIDA, L. E. et al. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.4, p.76-92, 1943.

CHEBEL, R.C.; DEMÉTRIO, D.G.B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v.69, p.98–106, 2008.

CHUN, S.Y. ET AL. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, v.137, p.1447–1456, 1996.

DIELEMAN et al. PMSG/ anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? **Theriogenology**, v.39, p.25–41, 1993.

DONALDSON, L.E. The day of estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.22, p.97-99, 1984.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211–1239, 2001.

FAIR, T.; LONERGAN, P. The Role of Progesterone in Oocyte Acquisition of Developmental Competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.142–147, 2012.

FILION F. et al. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.34323–34330, 2001.

FOOTE, R.H.; ONUMA, H. Superovulation, Ovum Collection, Culture and Transfer. A Review. **Journal of dairy science**, v.53, n.2, p.1681-1692, 1970.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225–232, 1994.

GIBBONS, J.R., WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v.60, p.72–77, 1999.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle. **Animal Reproduction Science**. v.20, p.187-200, 1989.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75–87, 1997.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v.63, p.383–389, 2000.

GORDON, I.R. **Reproductive Technologies in Farm Animals**. CABI Publishing: Cambridge, USA, 2005.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. ED. Manole LTDA: São Paulo, 1995. 582 p.

HASLER J.F. et al. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v.19, p.83–99, 1983.

HASLER J.F. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. **Theriogenology**, v.65, p.4–16, 2006.

HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v.81, p.152-169, 2014.

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Relationship between different concentrations of the plasma progesterone at the time of FSH-P treatment and the superovulatory response in Holstein dairy heifers. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, p.75–78, 2012.

KULICK, L.J. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v.52, p.913–921, 1999.

LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; CROWE, M.A. Estrus synchronization in cattle – current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: a review. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.1-16, 2008.

LOONEY, C. R. et al. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v.15, p.13–22, 1981.

LOONEY C.R. Superovulation in beef females. In: **Proceedings of the 5th Annual Convention of the AETA**. AETA, v.16–29, 1986.

LUCY, M.C. et al. Effect of timing of prostaglandin PGF(2) alpha injection subsequent to embryo collection on the resumption of normal follicular development following superovulatory treatment in cattle. **Theriogenology**, v. 34, p.7–19, 1990.

LUCY M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1277–93, 2001.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.42, p.601–11, 2002.

MAPLETOFT, R.J. **Bovine embryo transfer**. International Veterinary Information Service. Document No. R0104.1106, www.ivis.org, 2006.

MAPLETOFT R.J.; BÓ, G.A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.278-283, 2012.

MARTINEZ, M.F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.57, n.1-2, p.23-33, 1999.

MCCARTNEY, C.R.; BLANK, S.K.; MARSHALL, J.C. Progesterone acutely increases LH pulse amplitude but does not acutely influence nocturnal LH pulse frequency slowing during the late follicular phase in women. **The American journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, p.E900–E906, 2007.

MIHM, M; AUSTIN, E.J. The final stages of dominante follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166, 2002.

MIHM, M. et al. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**, v.74, p.1051–1059, 2006.

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

MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v.21, p.103–116, 1984.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Development Biology**, v.213, p.1–17, 1999.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, p.27–44, 1991.

NASSER, L. et al. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713–724, 1993.

NASSER, L.F. et al. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.76, p.320–327, 2011.

NICOL L. et al. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in LbetaT2 gonadotrophs. **Journal of Endocrinology**, v.196, p.497–507, 2008.

PFEIFER L.F.M. et al. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction**, v.6, n.3, p.473-480, 2009.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, n.7, p.915-923, 1995.

RIVERA, F.A. et al. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.141, p.333-342, 2011.

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v.65, n.1, p.112-118, 2001.

ROUILLIER, P. et al. Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. **Journal of Animal Science**. v.74, p-3012-3019, 1996.

SEIDEL, G.E. Superovulation and Embryo Transfer in Cattle. **Science**, v. 211, n.23, p.351-358, 1981.

SEIDEL, G.E. Applications of Embryo Transfer and Related Technologies to Cattle. **Journal of Dairy Science**, n.67, p.2786-2796, 1984.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1857–1872, 1994.

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.15, n.45, p.1091-102, 1996.

WEHRMAN, M.E. et al. Development of persistent ovarian follicles during synchronization of estrus influences the superovulatory response to FSH treatment in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.593–610, 1996.

WILDT, L. et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. **Endocrinology**, v.109, p.376 385, 1981.

WILTBANK, M.C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21–52, 2002.

WILTBANK, M.C. et al. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.238–243, 2011.