

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Tratamentos hormonais e seus efeitos em vacas doadoras e receptoras de
embriões de raças taurinas e sintéticas**

Wagner Marques de Lima

Pelotas, 2022

Wagner Marques de Lima

Tratamentos hormonais e seus efeitos em vacas doadoras e receptoras de embriões de raças taurinas e sintéticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L732t Lima, Wagner Marques de

Tratamentos hormonais e seus efeitos em vacas doadoras e receptoras de embriões de raças taurinas e sintéticas / Wagner Marques de Lima ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2022.

94 f. : il.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Marcadores endócrinos. 2. Progesterona. 3. Estrógeno. 4. Fecundação. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.208926

Wagner Marques de Lima

Tratamentos hormonais e seus efeitos em vacas doadoras e receptoras de embriões
de raças taurinas e sintéticas

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18/03/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rogério Ferreira
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

**Ao Professor José Diogo Gomes por ter
acreditado e, por oito anos, construído
o alicerce que permitiu minha evolução
na busca do conhecimento.**

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização dos estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin e ao co-orientador Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira pela amizade, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela confiança e pelo apoio durante esta jornada.

Aos Professores que pacientemente compartilharam seus conhecimentos e experiências.

Ao grupo FiBRA pela contribuição nos experimentos e discussão dos rumos das pesquisas e à CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo suporte financeiro.

À todos os funcionários e proprietários das fazendas nas quais foram executados parte dos experimentos.

À toda a equipe da BIOTEC: Danylo, Dênis, Elias, Luciana, Monique, Murilo e Nathalia que sem as suas contribuições nada teria sido possível.

Aos meus familiares que mesmo distantes sempre me apoiaram e torceram por mim em mais esta etapa da vida.

À Monique pelo apoio incondicional em todos os momentos desta caminhada e, sobretudo, pela parceria com a nossa Giovana.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

Resumo

Lima, Wagner Marques. **Tratamentos hormonais e seus efeitos em vacas doadoras e receptoras de embriões de raças taurinas e sintéticas**. 2022. 94f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE) possibilita multiplicar os descendentes de fêmeas selecionadas. Porém, a variabilidade na resposta individual ainda é uma limitação. Revisando dados de mais de seis mil coletas de embriões em diferentes raças taurinas e sintéticas, nas quatro estações do ano, observou-se que a média de embriões transferíveis é similar às relatadas há décadas, e que no outono aumenta a proporção de estruturas degeneradas ao passo que, no verão, aumentam as taxas de estruturas não fecundadas. Assim, ajustes no manejo e tratamentos hormonais poderiam possibilitar aumentar o número de embriões produzidos. Neste sentido, estudou-se o perfil endócrino, relacionando as concentrações de progesterona (P4) com a resposta à SOV e a produção de embriões em um protocolo estro base (EB), sendo avaliado o efeito da suplementação desta em doadoras de embriões. Vacas com menor concentração de P4 ($\leq 7,7$ ng/mL) no início do tratamento com FSH, apresentaram maior taxa de estruturas não fecundadas (NF; $P < 0,05$), enquanto vacas com concentração de P4 $> 7,7$ ng/mL obtiveram maior número de embriões e taxa de embriões/estruturas ($P < 0,05$). Em um segundo estudo, observou-se que dispositivos vaginais (DIV) contendo 1, 1,9 ou 3,8 g de P4 possibilitaram aumento nas concentrações séricas de P4 ($P < 0,001$) em vacas cíclicas previamente sincronizadas. Posteriormente, observou-se que a remoção, lavagem e reinserção de DIV no dia 4 (D4) do tratamento não aumenta as concentrações séricas de P4. Finalmente, a suplementação de P4 por meio de um DIV contendo 1 g de P4, não afetou a produção embrionária de doadoras de raças taurinas ou sintéticas, embora tenha sido observado aumento na proporção de estruturas não fecundadas nas vacas tratadas com P4. Conclui-se que há uma relação positiva entre as concentrações de P4 endógena, taxa de fecundação e de produção embrionária em doadoras submetidas à SOV/EB. Por fim, considerando a importância do preparo de receptoras nos programas de TE, com um protocolo que sincronize o estro e permita que o útero esteja adequado ao desenvolvimento embrionário, avaliamos a associação de cipionato de estradiol (CE) e GnRH na indução da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo (TETF). É bem estabelecido que o CE aumenta a proporção de vacas manifestando o estro, enquanto o GnRH promove ovulações mais sincronizadas. Neste experimento não foi observada diferença entre os tratamentos GnRH e CE+GnRH quanto a concentrações de P4, nem na taxa de prenhez após TETF. Coletivamente, os resultados obtidos demonstram que há possibilidade de incremento na produção de embriões *in vivo*, especialmente por meio da redução de estruturas não fecundadas e degeneradas. Ainda, as concentrações de progesterona durante a SOV-EB estão associadas com a produção embrionária,

porém, a suplementação de P4 não traz benefícios. Finalmente, a associação de CE+GnRH não traz benefícios na sincronização de receptoras de embriões bovinos.

Palavras-chave: marcadores endócrinos; progesterona; estrógeno; fecundação.

Abstract

Lima, Wagner Marques. **Hormonal treatments and their effects on donor and recipient cows from taurine and synthetic breeds.** 2022. 94f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Superovulation (SOV) and embryo transfer (ET) allow the multiplication of the offspring from selected females. However, the variability in individual response still represents a limitation. Data from more than six thousand uterine flushings were analyzed in different taurine and synthetic breeds, during the four seasons of the year. We found that the average number of transferable embryos is similar to that reported for decades, but in autumn the proportion of degenerated structures increases, whereas an increased rate of unfertilized structures was observed in the summer. Thus, adjustments in management and hormonal treatments would make possible to improve the number of produced embryos. In this regard, the endocrine profile of donor cows was evaluated, associating the progesterone (P4) concentration with the response to SOV and embryo production, in an estrus based (EB) protocol. The effect of P4 supplementation in embryo donors was also evaluated. Cows with lower P4 concentration (≤ 7.7 ng/mL) in the beginning of FSH treatment had higher rate of unfertilized structures (NF; $P < 0.05$), while cows with $P4 > 7.7$ ng/mL had higher number of embryos and embryo/structure ratio ($P < 0.05$). In a second study, it was observed that vaginal devices (IVD) containing 1, 1.9 or 3.8 g of P4 increased serum P4 concentrations ($P < 0.001$) in previously synchronized cyclic cows. Subsequently, we observed that the withdrawal, washing and reinsertion the IVD on day 4 (D4) of the treatment, did not increase serum P4 levels. Finally, P4 supplementation with IVD containing 1 g did not affect the embryo production of donors from taurine or synthetic breeds, although a significant increase in the proportion of non-fertilized structures was observed in P4-treated cows. We concluded that there is a positive relationship between endogenous P4 concentrations during FSH treatment, fertilization rate and embryo production in donors submitted to SOV/EB. Finally, considering the importance of preparing recipient cows using a protocol that synchronizes estrus/ovulation and allows an adequate uterine environment for embryonic development, we evaluated the association of estradiol cypionate (EC) and GnRH for ovulation induction for timed embryo transfer (TET). It is well established that EC increases the proportion of cows expressing estrus, while GnRH promotes more synchronized ovulations. In this experiment, we did not observe a significant difference between the GnRH and EC+GnRH treatments regarding P4 concentrations nor in the pregnancy rate after TET. Collectively, the results obtained indicate that there is a possibility of increasing the in vivo production of embryos, especially through the reduction of degenerated and non-fertilized structures. Also, the concentrations of progesterone during SOV/EB are associated with embryonic production, however, P4 supplementation does not improve

the outcome of SOV. Finally, the association of EC+GnRH does not bring benefits in the synchronization of recipient cows.

Keywords: endocrine markers; progesterone; estrogen; fertilization.

Lista de Figuras

Artigo 1 Fatores associados com a resposta superovulatória e produção embrionária em vacas de raças taurinas e sintéticas na região sul do Brasil

- Figura 1 Número médio de estruturas totais, embriões transferíveis, taxa de não fecundados (NF), estruturas degeneradas e taxa de embriões sobre o total de estruturas obtidas em 6.174 coletas de embriões de diferentes raças..... 47
- Figura 2 Mediana e intervalo de confiança referentes às estruturas totais, proporção de não fecundados (NF), embriões degenerados e embriões transferíveis nas diferentes estações do ano..... 48

Artigo 2 Concentração sérica de progesterona e sua relação com a produção de embriões de vacas de raças taurinas e sintéticas

- Figura 1 Protocolo de superovulação iniciado a partir de estro-base, aplicado em vacas doadoras de embriões 66
- Figura 2 Concentração de progesterona sérica em relação ao total de estruturas, taxa de não fecundados, número de embriões e taxa de embriões em relação as estruturas totais no D1 do protocolo de SOV..... 67
- Figura 3 Concentração de progesterona sérica em relação ao total de estruturas, taxa de não fecundados, número de embriões e taxa de embriões em relação as estruturas totais no D12 do protocolo de SOV..... 68

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 4 | Relação entre taxa de fecundação e concentração de progesterona após a luteólise, no dia da administração de GnRH (A) e no dia das inseminações (B) em vacas superovuladas..... | 69 |
| Figura 5 | Concentração de P4 sérica em vacas imunocastradas tratadas com dispositivos intravaginais contendo 1 g de P4 no D0..... | 70 |
| Figura 6 | Concentração de progesterona sérica em vacas submetidas à superovulação iniciada 9 a 11 dias após estro base, não tratadas (cont) ou tratadas com DIV contendo 1g de progesterona (P4) | 71 |
| Figura 7 | Produção embrionária em vacas submetidas à superovulação iniciada 9 a 11 dias após estro base, não tratadas (cont) ou tratadas com DIV contendo 1g de progesterona (P4) | 72 |
| Artigo 3 | Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer? | |
| Figure 1 | (A) Serum progesterone concentration and (B) Corpus Luteum (CL) diameter in cows treated with GnRH or EC+GnRH for ovulation induction | 84 |
| Figure 2 | (A) Pregnancy rates according to embryo source (fresh or frozen thawed) and (B) replicate for GnRH and EC+GnRH groups..... | 85 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----------------|---|----|
| Artigo 3 | Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer? | |
| Table 1 | Recipient utilization rates and pregnancy rates according to each treatment..... | 82 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|------|--|
| AMH | Hormônio antimulleriano |
| BE | Benzoato de estradiol |
| CE | Cipionato de estradiol |
| CL | Corpo Lúteo |
| °C | Grau Célsius |
| DIV | Dispositivo intravaginal |
| ECC | Escore da condição corporal |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equina |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| h | Horas |
| g | Gramas |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| IA | Inseminação artificial |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| IGF1 | Fator de crescimento semelhante a insulina 1 |
| LH | Hormônio luteinizante |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| Mm | Milímetro |
| N | Número |
| ng | Nanograma |
| NF | Não fecundado |
| P4 | Progesterona |
| SOV | Superovulação |
| TE | Transferência de embriões |
| TETF | Transferência de embriões em tempo fixo |
| THI | Índice de temperatura e umidade |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 Introdução..... | 16 |
| 2 Objetivos..... | 18 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 3 Artigos..... | 19 |
| 3.1 Artigo 1: Fatores associados com a resposta superovulatória e produção embrionária em vacas de raças taurinas e sintéticas na região sul do Brasil..... | 19 |
| 3.2 Artigo 2: Concentração sérica de progesterona e sua relação com a produção de embriões de vacas de raças taurinas e sintéticas..... | 49 |
| 3.3 Artigo 3: Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer? | 73 |
| 4 Considerações Finais..... | 86 |
| Referências..... | 88 |
| Anexos..... | 94 |

1 Introdução

As biotecnologias de reprodução assistida têm contribuído significativamente no progresso genético de rebanhos bovinos, sendo possível aumentar o número de descendentes de fêmeas zootécnica/geneticamente superiores por meio da transferência de embriões (TE). A produção de embriões bovinos *in vivo* tem sido desenvolvida ao longo de mais de 40 anos, no entanto a principal limitação é a variabilidade na resposta à superovulação (SOV) das doadoras. Existe a influência individual, como o número e a capacidade de desenvolvimento de folículos ovarianos mediante ao FSH exógeno. Porém, inúmeros fatores, como composição genética, condição corporal, idade, paridade, estação do ano, tipo de gonadotrofina utilizada para estimulação ovariana e o “status ovariano” no início do tratamento influenciam a resposta superovulatória (revisado por Mikkola et al., 2019). Assim diversos aspectos têm sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a resposta aos tratamentos superovulatórios. Uma alternativa à superovulação seria a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, especialmente em raças taurinas, a reduzida população de folículos antrais aspiráveis representa uma importante limitação, tornando a técnica menos viável em comparação com raças zebuínas. Além disso, embriões produzidos *in vivo* são mais tolerantes à criopreservação e, portanto, representam uma excelente alternativa para preservação de material genético.

Sabe-se que a resposta a SOV é afetada negativamente quando não é iniciada no momento da emergência de uma nova onda folicular, quando já existem folículos em processo de dominância. Nestes casos, a ablação folicular guiada por ultrassom (BARACALDO et al., 2000), ou por método manual (LIMA et al., 2007), permite mitigar o problema. No entanto, mesmo fêmeas mantidas sob as mesmas condições nutricionais e sanitárias e com perfis endócrinos semelhantes (mesma fase do ciclo estral), diferem significativamente quanto ao número de ovulações, fecundação e qualidade dos embriões recuperados após a SOV. Muitos estudos têm buscado identificar marcadores endócrinos e genéticos associados à diferentes respostas após SOV (revisado por Mikkola et al., 2019). Quanto ao ambiente uterino, não se conhece qual o perfil de expressão gênica seria mais favorável aos embriões, o que determina

a necessidade de buscar marcadores que influenciam no perfil endócrino e no ambiente uterino das doadoras que produzem embriões de melhor qualidade. Nesse sentido, WILEY et al. (2019) realizaram um estudo comparando protocolos de SOV com progesterona (P4) baixa (<5 ng/mL) ou P4 alta (>6 ng/mL) utilizando apenas um dispositivo intravaginal de liberação de P4 (DIV), fora do diestro, ou DIV com corpo lúteo (CL) ativo, respectivamente, durante a SOV. Os autores obtiveram um maior número de estruturas totais em vacas superovuladas com P4 alta em comparação com o grupo P4 baixa.

Para fêmeas bovinas, aumento nas concentrações de P4 pode ser obtido mediante suplementação com progestágenos por via oral, parenteral ou intravaginal, sendo que os DIVs possibilitam maior praticidade e controle das concentrações séricas, que variam de acordo com a dose de P4 no dispositivo. Ainda, é possível substituir o DIV durante o período de tratamento (IWAZUMI et al., 1994), ou utilizar dois dispositivos simultaneamente (BISINOTTO et al., 2013). Entretanto, em todos os casos, observa-se que as concentrações séricas de P4 geralmente sobem rapidamente e, posteriormente, diminuem ao longo do período de manutenção dos DIV.

Neste mesmo sentido, para a TE ser bem-sucedida, o útero da receptora deve apresentar ambiente condizente com a fase do desenvolvimento embrionário para continuar o desenvolvimento e, conseqüentemente, alcançar boas taxas de concepção. Muitos protocolos foram desenvolvidos com o propósito de sincronizar o ciclo estral de receptoras com a fase de desenvolvimento embrionário, usando diferentes fármacos, principalmente no que se refere aos indutores de ovulação. No Brasil os principais são o benzoato de estradiol (BE), GnRH e, principalmente, o cipionato de estradiol (CE) que, por suas características farmacodinâmicas, permite ser aplicado no momento da retirada do DIV, economizando assim um manejo na sincronização para transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Embora o CE apresente uma maior variação quanto ao momento de ovulação (SOUZA et al., 2009) a sua administração no pró-estro resulta na regulação da expressão gênica no endométrio (SÁ FILHO et al., 2017) e aumento na proporção de animais que manifestam cio, os quais tem maior probabilidade de emprenhar quando submetidos à inseminação em tempo fixo (IATF) (PFEIFER et al., 2020). Portanto, formulou-se a hipótese que a associação de CE e GnRH aumenta a taxa de prenhez de vacas de corte receptoras de embriões bovinos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar fatores que influenciam na resposta à SOV, possibilitando desenvolver ou aprimorar protocolos hormonais a fim de obter menor variação na resposta ovulatória, maior número de embriões de alta qualidade e maior taxa de prenhez, diminuindo o número de ciclos de SOV necessários para atingir o número desejado de descendentes de uma fêmea.

1.1.2 Objetivos específicos

1) apresentar fatores relacionados ao desempenho de doadoras de embriões de raças taurinas e sintéticas mantidas na região Sul do Brasil, bem como revisar marcadores endócrinos e genéticos associados à diferentes respostas aos protocolos de SOV e à qualidade dos embriões produzidos *in vivo*;

2) investigar a associação entre as concentrações de P4 durante a SOV e a produção embrionária;

3) determinar se a concentração de P4 no momento das inseminações artificiais afeta a taxa de fecundação em vacas superovuladas;

4) comparar as concentrações séricas de P4 após exposição a DIVs contendo diferentes doses de P4;

5) determinar se a remoção, lavagem e reinserção do DIV aumenta as concentrações séricas de P4;

6) determinar se a suplementação de P4 com DIV durante a SOV melhora a produção embrionária;

7) avaliar o efeito da combinação de CE e GnRH na indução da ovulação, sobre a função luteal e taxa de prenhez em vacas submetidas a TETF.

3 Artigo

3.1 Artigo 1

Fatores associados com a resposta superovulatória e produção embrionária em vacas de raças taurinas e sintéticas na região sul do Brasil

Wagner Marques de Lima, Arnaldo Diniz Vieira, Rafael Gianella Mondadori, Rogério Ferreira, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido a revista Animal Reproduction

Artigo de revisão

Running title: Resposta superovulatória e produção embrionária em vacas

Fatores associados com a resposta superovulatória e produção embrionária em vacas de raças taurinas e sintéticas na região sul do Brasil

Factors associated to superovulatory response and embryo production in taurine and synthetic breeds in southern Brazil

Wagner Marques de Lima¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0753-1325>), Arnaldo Diniz Vieira¹ (<https://orcid.org/0000-0003-2502-4108>), Rafael Gianella Mondadori¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0578-8469>), Rogério Ferreira² (<https://orcid.org/0000-0003-1349-7821>), Bernardo Garziera Gasperin^{1*} (<https://orcid.org/0000-0002-3715-2345>)

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

²Faculdade de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil

*Endereço atual do autor correspondente:

Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária. Código Postal: 96160-000

Capão do Leão, RS, Brasil. Tel.: +55 53 3275 7188

E-mail: bernardo.gasperin@ufpel.edu.br

Resumo

A indução de múltiplas ovulações/superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que possibilita multiplicar o número de descendentes de fêmeas selecionadas. Porém, a variabilidade na resposta individual representa uma importante limitação. A presente revisão apresenta dados originais de produção embrionária de mais de seis mil coletas em animais de diferentes raças

taurinas e sintéticas, nas diferentes estações do ano, em uma região de clima subtropical. Ainda, discute estudos investigando marcadores endócrinos e genéticos com potencial para prever a resposta à SOV. Com base em nossos dados, observa-se que o número médio de embriões transferíveis permanece similar aos relatados há décadas. É possível observar que, no outono, ocorre maior proporção de estruturas degeneradas ao passo que, no verão, ocorre incremento nas taxas de estruturas não fecundadas (NF). Desta forma, para algumas raças, há a possibilidade de aumentar o número de embriões com ajustes no manejo e tratamentos durante esses períodos. Os estudos revisados apontam grande potencial de marcadores endócrinos como as concentrações de AMH para prever a resposta à SOV/TE, devido sua boa correlação com o número de folículos no ovário. Adicionalmente, polimorfismos em genes como *FSHR*, *GDF9*, *IGFRI*, *INHBA* e *GRIAI* também têm sido investigados para predição de resposta superovulatória e qualidade embrionária, especialmente na raça Holandesa. Desta forma, há necessidade de se expandir a investigação em outras raças e de elucidar as mudanças funcionais relacionadas aos polimorfismos nos genes para que se possa identificar animais com maior potencial de resposta e desenvolver novas abordagens que favoreçam as múltiplas ovulações e obtenção do maior número de embriões viáveis.

Palavras-chave: transferência de embriões, marcadores endócrinos, marcadores genéticos, bovinos.

Abstract

Superovulation (SOV) and embryo transfer (ET) is the applied biotechnology that presents the greatest possibility for multiplication of the reproductive capacity of selected females. However, the difficulty of predicting individual responsiveness to hormonal treatments represents an important limitation. Therefore, the present review presents original data from embryo production from more than six thousand procedures performed in cows from different taurine and synthetic breeds, during the four seasons of the year, under subtropical conditions. Moreover, studies investigating endocrine and genetic markers as potential predictors of SOV response are discussed. Based on our data, the number of transferable embryos remain similar to those described decades ago. It is possible to observe that greater proportion of degenerated

structures are obtained on autumn, while on summer, an increase in unfertilized oocytes is observed. It is possible to infer that, for some breeds, it is possible to increase the number of embryos adjusting environmental conditions and hormonal treatments. Regarding endocrine markers, the revised studies demonstrate that the level of anti-mullerian hormone (AMH) measured before the onset of SOV represents one of the most reliable markers of response due to its correlation with the number of follicles in the ovary. Additionally, polymorphisms in genes such as *FSHR*, *GDF9*, *IGFRI*, *INHBA* and *GRIA1* have been investigated as potential predictors of superovulatory response and embryo quality, especially in Holstein cows. Therefore, there is a need to expand research to others breeds and to elucidate functional changes related to polymorphisms in genes to identify animals with greater response to SOV and to develop new approaches that favor multiple ovulations and the recovery of viable embryos.

Key words: embryo transfer, endocrine markers, genetic markers, cattle.

Introdução

A maximização do aproveitamento do potencial reprodutivo de fêmeas selecionadas por características produtivas ou genéticas é obtida com o contorno das perdas determinadas pelo processo de seleção folicular em espécies de ovulação única. A recuperação de ovócitos por aspiração folicular guiada por ultrassom e produção *in vitro* de embriões é a técnica que permite o maior aproveitamento dos folículos disponíveis, porém, as taxas de desenvolvimento embrionário e de prenhez obtidas por esse método ainda não são ideais, especialmente em fêmeas taurinas (de Vasconcelos et al., 2020). Este método tem como principal limitação a necessidade de uma estrutura laboratorial e de logística complexa, já que os embriões produzidos *in vitro* não respondem adequadamente a criopreservação. Já a produção *in vivo* de embriões é uma técnica que demanda de menor estrutura laboratorial e facilita a logística de transporte e armazenamento dos embriões devido a maior tolerância aos processos de resfriamento e criopreservação (Idrissi et al., 2021).

Independente da técnica, o número de folículos disponíveis nos ovários e a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos representam características individuais de cada doadora. Porém, fatores como composição genética, condição corporal, idade, paridade, estação do ano, tipo de gonadotrofina utilizada para estimulação ovariana e o “status ovariano” (população folicular e presença de corpo lúteo) no início do tratamento influenciam a resposta superovulatória (revisado por (Mikkola et al., 2019). Além das estruturas presentes no ovário, diversos outros fatores influenciam a resposta à indução de múltiplas ovulações/superovulação (SOV), uma vez que fêmeas mantidas sob mesmas condições alimentares e sanitárias, e sob perfis endócrinos semelhantes (mesma fase do ciclo estral), diferem significativamente quanto ao número de ovulações e qualidade das estruturas recuperadas após SOV.

Com base no acima exposto, diversos fatores têm sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a resposta aos tratamentos superovulatórios. A maioria dos estudos têm focado na identificação de marcadores endócrinos e genéticos associados à diferentes respostas após SOV (revisado por (Mikkola et al., 2019). Ainda, as características do ambiente uterino de fêmeas doadoras associadas à qualidade dos embriões têm sido investigadas.

A identificação das condições ambientais, genótipos e fenótipos associados à melhor resposta superovulatória e melhor qualidade dos embriões possui impacto significativo em nível de pesquisa básica, através da elucidação de processos fisiológicos envolvidos na foliculogênese e embriogênese. Na aplicação no sistema produtivo, a identificação de características capazes de prever a resposta dos animais a SOV possibilitará um ganho significativo na multiplicação de animais geneticamente superiores. Tal avanço, fornecerá subsídios para a elaboração e/ou adaptação de protocolos hormonais e/ou estratégias de manejo que possibilitem condições mais adequadas para a produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. Portanto, o objetivo da presente revisão é apresentar fatores relacionados ao desempenho de doadoras de embriões de raças taurinas e sintéticas mantidas na região Sul do Brasil, bem como

revisar marcadores endócrinos e genéticos associados à diferentes respostas aos protocolos de SOV e à qualidade dos embriões produzidos *in vivo*.

Composição racial das doadoras

É bem estabelecido que as subespécies *Bos taurus taurus* (taurinos) e *Bos taurus indicus* (zebuínos) apresentam marcada diferença em diversos aspectos reprodutivos. No que se refere à fisiologia ovariana, fêmeas zebuínas possuem maior número de folículos antrais presentes no ovário, independente da fase do ciclo estral (Batista et al., 2014). A divergência folicular ocorre mais precocemente em fêmeas zebuínas, quando o folículo dominante atinge cerca de 6 mm de diâmetro, enquanto em fêmeas taurinas o mesmo processo é observado quando o dominante atinge 8,5 mm. Da mesma forma, a capacidade ovulatória do folículo dominante é alcançada mais precocemente em zebuínas (cerca de 10 mm) em comparação com taurinas (12 mm) (Carvalho et al., 2008).

No que se refere à produção de embriões, a maior população de folículos antrais em fêmeas zebuínas, favorece a produção *in vitro* uma vez que há maior número de folículos aspiráveis e, conseqüentemente, obtenção de maior número de ovócitos. Entretanto, essa característica não parece ter grande influência na produção *in vivo*. Conforme revisado por Silva et al. (2009), analisando mais de 500 coletas, o número médio de embriões transferíveis obtidos de fêmeas Nelore ficou entre $4,5 \pm 0,5$ e $6,2 \pm 0,5$. Como pode ser observado na Figura 1, no levantamento que considera 6.174 coletas realizadas pela nossa equipe, entre os anos de 2014 e 2020, foi observado número médio de $7,0 \pm 0,8$ embriões transferíveis por procedimento, em vacas de raças taurinas e sintéticas, representando aproximadamente 60% das estruturas totais coletadas. Conforme revisado por Mikkola et al. (2019) poucos estudos compararam a produção embrionária em diferentes raças sob condições controladas, o que pode explicar algumas divergências nos dados observados. Coletivamente, os estudos sugerem que a composição

racial, que tem marcada influência na população folicular antral, não representa um fator determinante do número médio de embriões transferíveis recuperados em cada coleta.

Flutuações na produção de embriões nas diferentes estações do ano

Ao nosso conhecimento, poucos estudos investigaram o efeito das condições climáticas ou da estação do ano sobre a produção embrionária. Conforme pode ser observado na Figura 2, avaliando 6.174 coletas, o número de estruturas totais e proporção de embriões transferíveis não apresenta oscilação significativa ao longo das estações do ano. Entretanto, pode-se observar um aumento na proporção de não fecundados (NF) durante o verão, em comparação com as demais estações. Esse fato pode ser explicado porque o estresse térmico afeta a taxa de ovulação, fertilização e de embriões transferíveis (Ratchamak et al., 2021), bem como o metabolismo embrionário (Amaral et al., 2020). Curiosamente, observa-se maior proporção de embriões degenerados no outono, em comparação com a primavera e o verão. Isso poderia ser uma consequência tardia da exposição dos animais a elevados índices de temperatura e umidade (THI) durante o verão, visto que a evolução de folículo primordial a ovulatório, em vacas, tem uma duração média de 80 a 100 dias (Britt, 1991).

Um estudo conduzido com vacas da raça Holandesa no sudoeste do Brasil, em região de clima tropical úmido, identificou um decréscimo no número de estruturas fecundadas, embriões transferíveis e aumento na taxa de embriões degenerados (Vieira et al., 2014) nos meses de temperatura mais elevada (novembro a maio). Os efeitos das condições climáticas adversas foram mais pronunciados em vacas do que em novilhas. Outros estudos conduzidos na América do Norte não observaram efeito da estação do ano, embora em situações de calor ou frio extremo, foram relatados prejuízos na produção embrionária (revisado por (Mikkola et al., 2019)). Os dados demonstrados no presente estudo foram obtidos de raças taurinas e sintéticas não confinadas, na grande maioria, o que limita as possibilidades de alterar as

condições ambientais. Entretanto, é possível inferir que abordagens que possibilitem um maior controle do momento das ovulações, ou a utilização de uma inseminação adicional, poderiam prevenir o aumento na proporção de estruturas não fecundadas observadas no verão, uma vez que podem ser decorrentes de ovulações “atrasadas” em decorrência do estresse térmico.

Controle hormonal da onda folicular

Uma boa resposta superovulatória é determinante para o sucesso de um programa de SOV/TE. Portanto, para obter o maior número possível de ovulações e, conseqüentemente, uma grande quantidade de embriões de boa qualidade que resulte em altas taxas de prenhez, faz-se a administração de hormônios exógenos. Empiricamente foi estabelecido que as melhores respostas a SOV eram obtidas quando o tratamento iniciava de 8 a 12 dias após um cio base. Mais tarde essa observação foi justificada pela descoberta de que nesse período era possível iniciar o tratamento no início de uma onda folicular sob altas concentrações de progesterona (P4). Nos últimos anos houve um progresso significativo no entendimento da fisiologia e da atividade hormonal, permitindo melhor controle da atividade ovariana. Isso possibilitou iniciar a SOV no momento mais adequado, através da sincronização da onda folicular, que pode ser por meios físicos ou hormonais.

Uma forma de controle físico é a ablação do(s) folículo(s) dominante(s), visto que estes exercem influência negativa no início da SOV. Quando este procedimento foi realizado 24h antes, ou no momento do início das aplicações de FSH, houve um ganho significativo no número de embriões viáveis ($10,9 \pm 0,89$ e $10,3 \pm 0,94$, respectivamente) em comparação à fêmeas sem folículos palpáveis ($8,1 \pm 0,51$) ou com folículos palpáveis não removidos ($6,4 \pm 0,67$) (Lima et al., 2007). A ablação folicular guiada por ultrassom (Bodensteiner et al., 1996; Baracaldo et al., 2000) ou pelo uso de um dispositivo simplificado (Lima et al., 2007) mostrou-se eficiente ao proporcionar o surgimento de uma nova onda em 24 a 48 horas. Apesar da

necessidade de equipamentos específicos ou de desenvolver habilidade manual para realizar esta técnica, ela permite iniciar a SOV em qualquer fase do ciclo estral da doadora (Bergfelt et al., 1997). Além disso, é mais uma importante ferramenta para sincronização da onda folicular em países onde o uso do estradiol não é permitido na reprodução bovina.

O controle hormonal da onda folicular pode ser realizado pela administração de GnRH (Bodensteiner et al., 1996), ou ésteres de estradiol (Bo et al., 1996). O GnRH promove o surgimento de uma nova onda dois dias após sua aplicação. Porém o percentual de vacas que ovulam, que é requisito para o início da nova onda, varia conforme a fase do ciclo estral que estas se encontram no momento do tratamento (Martinez et al., 1999). Quando foi comparada a sincronização da onda folicular com a aplicação de estradiol ou GnRH, três dias após a inserção de um dispositivo contendo 1,38g de progesterona (P4), o resultado foi semelhante quanto ao número de embriões recuperados (10.86 ± 0.97 e 11.14 ± 0.99 ; $P= 0.75$), número de embriões grau 1 e 2 (5.65 ± 0.66 e 5.64 ± 0.68 ; $P= 0.98$) e proporção de estruturas fecundadas ($59.9 \pm 4.15\%$ e $56.43 \pm 4.38\%$; $P=0.52$), respectivamente (Wock et al., 2008). Bo et al. (1996) associaram estradiol 17β (E- 17β) à P4 e observaram o surgimento de uma nova onda 4,3 dias após a o tratamento, obtendo resultados na SOV e produção de embriões semelhante ao método tradicional do estro base. A sincronização com estradiol é a técnica mais empregada atualmente, em países em que seu uso é permitido.

Para promover a SOV, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) foi o hormônio mais utilizado nos estudos pioneiros. Porém, após observações de Elsdén et al. (1978), passou-se a usar FSH, que apresentou-se mais efetivo na produção de múltiplas ovulações. Dentre as formulações de FSH oriundas de extrato pituitário, há variações quanto às concentrações de LH e, embora este hormônio seja importante para a foliculogênese e ovulação, dados demonstram que altas concentrações de LH na SOV levam a produção de estruturas não fecundadas, degeneradas e embriões de baixa qualidade (Mapletoft et al., 2002).

Atualmente no Brasil apenas dois produtos à base de FSH são comercializados para SOV em bovinos, Folltropin e Pluset. Ao passo que o Folltropin tem cerca de 85% da sua fração de LH removida na sua elaboração, o Pluset mantém a relação de 1:1 para FSH:LH (Mikkola and Taponen, 2017). Enquanto Kelly et al. (1997), encontraram maior produção de embriões congeláveis para Folltropin em relação ao Pluset ($5,5 \pm 1,2$ e $3,8 \pm 1,0$, respectivamente), Carvalho et al. (2013), não observaram diferença na média de embriões produzidos ($5,0 \pm 4,02$ e $4,7 \pm 6,11$ para Pluset e Folltropin, respectivamente), embora houve variação entre raças e diferença quanto ao número de corpos lúteos e de estruturas coletadas.

Em uma avaliação retrospectiva de nossas atividades, a partir de mais de 900 coletas de embriões das raças Angus, Brangus e Braford, realizadas nos anos de 2020 e 2021, não foi observada diferença na taxa de não fecundados, estruturas degeneradas e embriões transferíveis após SOV com Folltropin ou Pluset. Apesar das coletas após SOV com as diferentes formulações de FSH não terem sido realizadas simultaneamente, os dois produtos possibilitaram a obtenção de 6 a 7 embriões transferíveis. Nossos dados corroboram com os achados de Mikkola and Taponen (2017), que também não observaram diferença na quantidade, qualidade e estágio de desenvolvimento de embriões após superovulação com Folltropin ou Pluset em vacas e novilhas de leite.

Além da variação individual à SOV e da apresentação farmacológica do FSH, a adequação da dose hormonal é um ponto muito importante a ser trabalhado. Comumente são usados de 28 a 50 mg (Armour) de extrato de pituitária (FSH-P), em um regime de oito a dez aplicações distribuídas em intervalos de 12 h e em doses decrescentes (Bó and Mapletoft, 2014). Embora se observem variações entre raças bovinas e, principalmente, entre indivíduos, em nossa rotina temos utilizado doses de 240 a 320 mg NIH-FSH-P1 para vacas *Bos taurus* e de 120 a 240 mg NIH-FSH-P1 para as vacas de raças sintéticas (*Bos taurus x Bos indicus*),

ajustando a dose em protocolos subsequentes conforme a resposta da SOV obtida em cada indivíduo.

Devido a meia vida curta do FSH, de apenas 5 h ou menos, substâncias como hidróxido de alumínio, ácido hialurônico e polietileno glicol (revisado por Deguettes et al. (2020), têm sido usadas para prolongar a sua atividade mediante redução na velocidade de biodisponibilização. Esses veículos permitiram SOV com resultados satisfatórios, realizando apenas uma ou duas aplicações (Tríbulo et al., 2011), o que resulta em menor mão de obra para aplicações, diminuindo o risco de acidentes com os animais e pessoas envolvidas no processo, além de melhorar o bem-estar animal pela redução dos manejos, bem com reduzir os riscos de erros humanos. Infelizmente, não há formulações para liberação lenta de FSH disponíveis comercialmente no Brasil.

Fatores endócrinos associados a resposta à SOV

O perfil endócrino da fêmea bovina é determinado pela interação entre hipotálamo, hipófise, gônadas e útero. Ainda, o metabolismo apresenta forte influência sobre as concentrações circulantes dos hormônios reprodutivos, sendo relatadas diferenças marcantes entre taurinos e zebuínos, especialmente quanto ao metabolismo da P4. Por exemplo, sabe-se que novilhas zebuínas alcançam concentrações circulantes superiores em comparação às taurinas quando expostas às mesmas doses de P4 intravaginal. Ainda, fêmeas de aptidão leiteira metabolizam os esteroides mais rapidamente, em comparação às fêmeas de corte. Com base neste conhecimento, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e SOV têm sido adaptados às diferentes subespécies e suas cruzas e de acordo com a aptidão e condição das fêmeas (nulíparas ou múltíparas, lactantes ou não etc.).

No que se refere à influência do perfil endócrino sobre a resposta à SOV, em um estudo utilizando vacas Angus e Simental, observou-se que maiores concentrações de P4 endógena

durante o período de tratamento com FSH possibilitaram a obtenção de maior número de embriões totais (19,3 vs. 10,7) e transferíveis (11 vs. 7,9), em comparação com baixas concentrações de P4 (Wiley et al., 2019), embora os mecanismos associados não tenham sido investigados. No mesmo estudo, vacas com elevada P4 durante a SOV também apresentaram maior número de estruturas de baixa qualidade (grau 3 e 4). Em fêmeas zebuínas, as concentrações de estradiol no dia do estro apresentaram correlação positiva linear com o número de embriões coletados (Gradela et al., 1994). Uma vez que vacas superovuladas apresentam grande número de folículos em processo de luteinização simultaneamente, formulamos a hipótese de que concentrações de P4 elevada no momento das inseminações poderiam prejudicar a taxa de fecundação. Entretanto, essa hipótese não foi confirmada, sendo que em vacas com 100% de estruturas fecundadas houve uma tendência ($P = 0,08$) de maior concentração de P4 no dia da administração do GnRH em comparação com vacas com mais de 35% de estruturas não fecundadas (dados não publicados). Comparando novilhas e vacas Holandesas em lactação, a melhor resposta à SOV em novilhas esteve associada com concentrações mais elevadas de P4 durante a SOV, 5 e 7 dias após o estro (Chagas e Silva et al., 2002), embora essa comparação seja pouco pertinente devido às diferenças alimentares e metabólicas entre as categorias.

Além dos esteroides ovarianos, outros marcadores têm sido investigados quanto à associação à resposta aos protocolos de SOV, como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), sabidamente envolvido na foliculogênese antral, e o hormônio anti Mülleriano (AMH). O AMH é um dos marcadores mais fidedignos de resposta à SOV em humanos, estando envolvido na regulação da ativação de folículos pré-antrais e sendo expresso principalmente pelas células da granulosa bovina de folículos pequenos (3 a 7 mm) e saudáveis (Rico et al., 2009). Após o primeiro estudo demonstrando o potencial do AMH como marcador de resposta à SOV em fêmeas da raça Holandesa (Rico et al., 2009), outros confirmaram a

grande associação entre as concentrações de AMH e resposta à SOV em vacas sob diferentes condições (Hirayama et al., 2012; Souza et al., 2015; Abdel Aziz et al., 2017). Em um estudo investigando a relação entre as concentrações sistêmicas de IGF1 e AMH em vacas Holandesas lactantes, observou-se altas correlações entre as concentrações de AMH antes do início do tratamento de SOV e o número de corpos lúteos (CL; $r = 0,71$), número de embriões totais e transferíveis ($r = 0,67$ e $r = 0,51$, respectivamente). Ainda, as concentrações de AMH foram positivamente correlacionadas ao número de embriões de elevada qualidade (grau 1; $r = 0,5$) (Abdel Aziz et al., 2017). Os mesmos autores observaram que vacas com altas concentrações de AMH apresentaram mais que o dobro de embriões transferíveis e embriões grau 1 em comparação às vacas com baixas concentrações de AMH, o que já havia sido demonstrado em outro estudo (Souza et al., 2015). Já as concentrações de IGF1 no dia do estro foram associados à maior número de embriões grau 1 ($r = 0,38$) e, no dia da coleta de embriões, associados ao número de CLs ($r = 0,36$) e de embriões totais ($r = 0,31$).

Em outro estudo, observou-se correlação positiva entre as concentrações de IGF1 no dia da coleta com o número de embriões totais ($r = 0,42$) e viáveis ($r = 0,43$) em vacas, mas não em novilhas da raça Holandesa (Velazquez et al., 2005). Neste último estudo, investigando as concentrações de insulina, IGF1 e colesterol, concluiu-se que uma única mensuração destes marcadores no momento da coleta de embriões apresenta limitada aplicabilidade, explicando apenas 8,9, 13,9 e 15,8% da variação na produção de embriões, respectivamente.

Apesar das limitações de estudos baseados em associações, as informações obtidas mostram claramente a superioridade do AMH em comparação ao IGF1 e outros fatores metabólicos como marcador de resposta à SOV antes do início do tratamento. Outra vantagem relacionada ao uso do AMH como marcador está relacionada ao fato de que as concentrações plasmáticas deste hormônio apresentam variação entre indivíduos mas pouca flutuação ao longo do tempo em cada indivíduo (Rico et al., 2009), não sendo regulado ao longo do ciclo estral

(Souza et al., 2015). A utilização dos referidos marcadores na seleção de fêmeas doadoras esbarra no elevado custo das análises. Ainda, é importante salientar que as doadoras devem ser selecionadas pelo mérito genético, e não pelo potencial de resposta a SOV. Por outro lado, a identificação de fêmeas não responsivas por meio de marcadores poderia evitar gastos com hormônios, transporte e manutenção de doadoras não responsivas em centrais de coleta de embriões.

Marcadores genéticos para predição de resposta à SOV

Nos últimos anos, as técnicas de identificação de genótipos associados às características de interesse zootécnico avançaram significativamente. No que diz respeito à SOV, marcadores genéticos apresentam grande potencial para a seleção precoce de indivíduos com maior potencial de resposta. Entretanto, a maioria dos estudos disponíveis na literatura foram realizados com vacas Holandesas, devido à maior disponibilidade de registros e maior número de procedimentos realizados, especialmente na América do Norte. Portanto, há necessidade de realização de estudos em raças de corte taurinas, zebuínas e sintéticas.

Uma análise genética no Canadá, avaliou dados de 137.446 coletas realizadas em 54.463 vacas Holandesas cadastradas no *Canadian Dairy Network Database*, considerando a resposta superovulatória e outros parâmetros produtivos e reprodutivos (Jaton et al., 2016). Os autores concluíram que a seleção de fêmeas com melhor resposta superovulatória estaria associada a uma pequena redução da produção de leite, proteína e gordura, mas, por outro lado, positivamente associada a um incremento em outros parâmetros funcionais, inclusive em parâmetros reprodutivos. No mesmo estudo, quando mensurado o efeito da doadora, foi observada herdabilidade de 0,17 e 0,14 e repetibilidade de 0,28 e 0,24 para o número de embriões totais e viáveis, respectivamente. Os dados obtidos demonstram que a resposta à SOV,

embora seja uma característica herdável e apresente repetibilidade, depende de vários fatores ambientais.

Quanto à identificação de marcadores genéticos associados à resposta a SOV, a maioria dos estudos têm investigado polimorfismos em genes relacionados à parâmetros reprodutivos como no receptor de FSH (*FSHR*) (Yang et al., 2010; Cory et al., 2013), de LH (*LHCGR*) (Yang et al., 2012), de IGF1 (*IGF1R*) (Yang et al., 2013), no gene do fator de crescimento e diferenciação 9 (*GDF9*) (Tang et al., 2013), gene da subunidade β A da inibina (*INHBA*) (Yang et al., 2014), entre outros.

O gene do *FSHR* é um dos mais investigados quanto à polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*; SNP), especialmente em mulheres, onde estão associados a diversos transtornos ovarianos como falência ovariana precoce, síndrome do ovário policístico, e com a resposta à SOV. Neste último caso, há relatos de polimorfismos associados à síndrome da hiperestimulação ovariana, condição na qual mulheres apresentam uma resposta exacerbada a SOV.

Em bovinos, buscando identificar polimorfismos nos genes dos receptores de gonadotrofinas, Cory et al. (2013) observaram sete SNPs no gene do *FSHR* (exons 1-10). Em vacas Holandesas, estes SNPs repercutem em alterações em aminoácidos na proteína do *FSHR* potencialmente alterando a funcionalidade ou a estrutura do receptor. O SNP c.337C>G em homozigose (GG) está associado a uma maior porcentagem de embriões viáveis. Já para o SNP c.871A>G, vacas homozigotas (AA) apresentaram menos embriões viáveis e mais estruturas não fecundadas, o mesmo observado nas vacas homozigotas (GG) para o SNP c.1973C>G. Em um estudo realizado com vacas da raça Chinese Holstein (Yang et al., 2010), resultantes do cruzamento de Holandês com uma raça nativa chinesa, foi identificado um SNP na região do promotor do gene do *FSHR* (G-278A), que potencialmente afeta a expressão e consequente quantidade de receptores de FSH nas células ovarianas. Neste estudo, vacas com o genótipo CC

apresentaram maior número de estruturas totais e embriões transferíveis (11,1 e 6,7) em comparação às CD (7 e 3,6) e DD (6,4 e 3,9), respectivamente. Ainda, todas as vacas não responsivas à SOV apresentaram genótipo CD ou DD. Os resultados sugerem que a genotipagem de vacas para os SNPs no FSHR pode possibilitar a identificação de vacas com boa ou má resposta à SOV, embora estudos em populações com maior número de animais ainda sejam necessários. Ainda investigando SNPs nos receptores de gonadotrofinas, Yang et al. (2012) identificaram polimorfismos no gene do LHCGR (intron 9). Os quatro polimorfismos identificados influenciaram o número total de estruturas, enquanto dois (A51703G e A51726G) também influenciaram o número de embriões transferíveis.

Devido à grande relevância do IGF1 na foliculogênese, polimorfismos no gene do seu principal receptor (IGFR1) também têm sido investigados como potenciais marcadores de resposta à SOV. Yang et al. (2013) identificaram dois genótipos para o SNP G404T no gene IGFR1, sendo que fêmeas GG apresentaram 1,46 mais estruturas e 0,834 mais embriões transferíveis em comparação ao genótipo GT.

Genes que codificam as proteínas sintetizadas pelos ovócitos como o GDF9 e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), também são potenciais candidatos para identificação de SNPs associados à resposta à SOV. Mutações inativadoras espontâneas nos genes da BMP15 e GDF9 já foram identificadas em ovinos, sendo observado um incremento na taxa ovulatória, quando em heterozigose e, paradoxalmente, esterilidade quando a mutação ocorre em homozigose. Ainda, mutações aditivas no receptor da BMP15 (BMPRI1B) estão associadas à aumento na taxa ovulatória em ovinos. Com base no envolvimento do GDF9 na determinação da taxa ovulatória, Tang et al. (2013) identificaram dois polimorfismos (A485T e A625T) relacionados ao número de embriões transferíveis, suportando a hipótese de que mutações nos genes desta proteína também são potenciais marcadores de resposta a SOV.

Além dos fatores ovocitários, a inibina, produzida localmente nos folículos é sabidamente envolvida na inibição da síntese e secreção hipofisária de FSH, influenciando na resposta à SOV. A imunização contra a subunidade α da inibina aumenta o número de embriões transferíveis e a qualidade embrionária em novilhas inseminadas com sêmen sexado (Li et al., 2009). Entretanto, não foram identificados marcadores no gene da subunidade βA da inibina (INHBA; que compõe a proteína inibina A) associados à resposta à SOV (Yang et al., 2014).

Estudos investigando polimorfismos em genes candidatos apresentam a limitação de serem restritos aos genes sabidamente envolvidos em aspectos reprodutivos. Por outro lado, técnicas mais modernas como *Genome Wide Association* (GWAS) possibilitam uma investigação no genoma completo, identificando genótipos distintos em genes cujas funções são, muitas vezes, desconhecidas. Ao nosso conhecimento, há apenas um estudo utilizando GWAS com enfoque em resposta à SOV (Sugimoto et al., 2010). No referido estudo, realizado com vacas *Bos taurus* (Japanese Black cattle), identificou-se uma mutação no gene do receptor ionotrópico de glutamato AMPA-1 (*GRI1*), que resulta na troca de um aminoácido serina (*GRI1^{ser}*) por asparagina (*GRI1^{asn}*), repercutindo em menor afinidade ao glutamato. Uma vez que o glutamato induz a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), células hipotalâmicas *GRI1^{asn}*, transfectadas *in vitro*, apresentaram menor liberação de GnRH após tratamento com glutamato em comparação às *GRI1^{ser}*. Isso explica, ao menos em parte, o motivo pelo qual vacas *GRI1^{ser}* apresentam, em média, seis estruturas (ovócitos e embriões) a mais em comparação às *GRI1^{asn}*. Estudos como este, aliando ferramentas modernas como GWAS à experimentos funcionais possuem grande potencial, não só para a identificação de marcadores genéticos de melhor resposta à SOV, como também para a elucidação das funções de fatores muitas vezes desconhecidos na foliculogênese e determinação da taxa ovulatória. A combinação de avaliações da população ovariana através de ultrassonografia, concentrações

circulantes de AMH e polimorfismos no GRIA1 possibilitou a identificação de vacas produtoras de maior número de embriões transferíveis (Hirayama et al., 2012).

Relação do ambiente uterino com a produção embrionária

Além dos marcadores endócrinos e genéticos associados à melhores respostas à SOV, há a necessidade de se entender a relação entre o ambiente dos ovidutos e útero na viabilidade dos embriões coletados. A análise das células do epitélio do oviduto é mais difícil, uma vez que as mesmas só podem ser obtidas mediante acesso cirúrgico ou em abatedouro. Por outro lado, células endometriais podem ser obtidas através de citologia (cytobrush), biópsias endometriais (não indicadas para fêmeas inseminadas), ou através da recuperação das células obtidas durante a lavagem uterina. Apesar de serem mais facilmente obtidas, há pouca informação sobre as características das células endometriais obtidas de vacas submetidas à SOV. A realização de técnicas moleculares avaliando o transcriptoma e proteoma das células endometriais, relacionando-os com a qualidade dos embriões recuperados poderia auxiliar na identificação de características favoráveis para o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o processo de SOV causa profundas modificações no transcriptoma do endométrio e dos embriões (Forde et al., 2012), em parte pelas concentrações mais elevadas de P4 aos quais as vacas superestimuladas são expostas, quando comparado com o diestro natural.

Em um estudo utilizando a técnica de microarranjo (*microarray*), aos sete dias após a IA foi identificado um aumento na expressão de 795 genes e redução na expressão de 439 genes em novilhas (Charolês e Limousin) superovuladas, em comparação a novilhas com apenas uma ovulação. Maiores alterações foram observadas em genes relacionados ao ciclo e movimentação celular, metabolismo de lipídeos, vitaminas e minerais (Forde et al., 2012). Os mesmos autores demonstraram que a SOV afeta 10 vezes mais genes em comparação às fêmeas

expostas somente a concentrações elevadas de P4 (Forde et al., 2009), sendo que apenas 22 genes tiveram regulação semelhante entre os modelos de SOV e suplementação de P4.

As concentrações de P4 circulantes em vacas superovuladas influenciam o crescimento dos embriões (coletados no dia 13), uma vez que há um efeito quadrático entre as concentrações de P4 sistêmicas e concentrações intrauterinas de glicose (Matsuyama et al., 2012). Além das concentrações de glicose, alguns parâmetros bioquímicos são alterados no útero de fêmeas superovuladas (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014), variando com o número de embriões presentes. Em um estudo em vacas Holandesas, as concentrações uterinas de beta-N-acetylglucosaminidase (β NAGASE) estiveram positivamente relacionados ao número de embriões totais e transferíveis em fêmeas com até quatro CLs por ovário. Entretanto, baixas concentrações de β NAGASE foram observadas em vacas com melhor resposta superovulatória (> 4 embriões por corno) (Tsiligianni et al., 2007). Em outro estudo utilizando vacas Holandesas lactantes submetidas à SOV, o número de embriões transferíveis esteve positivamente correlacionado às concentrações de P4 sérica ($r = 0,76$) e negativamente associado ($r = -0,57$) às concentrações de metabólitos de prostaglandina F 2α (PGFM) séricas (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014). Embora os dados de estudos associativos sejam interessantes, os mecanismos pelos quais os diferentes marcadores afetam a viabilidade embrionária ainda necessitam ser investigados.

Conclusões

Com base em nossos dados, pode-se concluir que a composição genética e a época do ano influenciam a resposta das vacas a SOV e a produção embrionária. Os dados sugerem que um incremento nas taxas de fecundação poderia repercutir em uma melhor produção embrionária. Além disso, adaptações ambientais, para aumentar o conforto térmico e garantir

uma nutrição mais constante ao longo do ano, poderiam diminuir as estruturas NF e degeneradas.

Os fatores envolvidos na variabilidade da resposta à SOV e na qualidade dos embriões recuperados ainda são pouco conhecidos. A maioria dos dados obtidos são provenientes de vacas Holandesas e, não necessariamente, se repetirão em outras raças, sendo necessária a realização de estudos em raças de corte.

Estudos identificaram potenciais marcadores em genes relacionados às funções reprodutivas, sendo que alguns polimorfismos parecem explicar, em parte, a variação na resposta à SOV. Técnicas modernas de sequenciamento genômico poderão contribuir significativamente no entendimento da influência gênica sobre a resposta à SOV.

Até o presente momento, as concentrações de AMH circulantes representam o melhor marcador para prever a resposta à SOV, embora outros fatores endócrinos tenham sido investigados. Quanto à qualidade embrionária, mensurada pelo número de embriões transferíveis, ainda pouco se sabe sobre as condições endócrinas, tubáricas e uterinas que possibilitam um desenvolvimento embrionário mais adequado. As concentrações de P4 e PGFM parecem influenciar na quantidade de embriões transferíveis, embora os estudos obtidos até então sejam restritos às correlações.

A utilização conjunta de diferentes marcadores de resposta à SOV facilitará a identificação precoce de doadoras com maior potencial de resposta. Ainda, a realização de estudos funcionais que identifiquem o efeito isolado de fatores relacionados a melhor resposta à SOV e/ou ao desenvolvimento de embriões de melhor qualidade fornecerão subsídios para o aprimoramento de tratamentos para produção de embriões *in vivo* e *in vitro*.

Contribuição dos autores

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS Edital 06/2021 – RITEs-RS, 22/2551–0000391–5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Declaração de conflito de interesse

Não há conflitos de interesse a declarar.

Referências

- Abdel Aziz RL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E, Kasimanickam RK. Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology*. 2017; 100:72-79. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.06.007.
- Amaral CS, Koch J, Correa Júnior EE, Bertolin K, Mujica LKS, Fiorenza MF, Rosa SG, Nogueira CW, Comim FV, Portela VVM, Gonçalves PBD, Antoniazzi AQ. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 2020; 87:899-909. <https://doi.org/10.1002/mrd.23407>.
- Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 2000; 53:1239-1250. doi:10.1016/S0093-691X(00)00268-5.
- Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, MF SF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Rennó FP, Baruselli PS. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular

- population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49:448-452.doi: 10.1111/rda.12304.
- Bergfelt DR, Bo GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci.* 1997; 49:1-12.doi: 10.1016/s0378-4320(97)00064-x.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology.* 1996; 45:897-910.doi: 10.1016/0093-691x(96)00020-9.
- Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology.* 2014; 81:38-48.doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.020.
- Bodensteiner KJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology.* 1996; 45:1115-1128.doi: 10.1016/0093-691x(96)00068-4.
- Britt J. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *The Bovine Practitioner Proceeding.* 1991; 24:39-43. <https://doi.org/10.21423/aabppro19916706>.
- Carvalho B, Varago F, Ruas J, Vargas M, Santos G, Silva A. Embryo production in zebu cows after superovulation with two commercial formulations of gonadotropin. *R. bras. Ci. Vet.* 2013; 20:155-159.
- Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology.* 2008; 69:167-175.doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.035.
- Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim Reprod Sci.* 2002; 69:1-8.doi: 10.1016/s0378-4320(01)00172-5.

- Cory AT, Price CA, Lefebvre R, Palin MF. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Animal genetics*. 2013; 44:197-201. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02380.x.
- De Vasconcelos GL, da Cunha EV, Maculan R, Sánchez Viafara JA, Barbalho Silva AW, Souza Batista AL, Viana Silva JR, de Souza JC. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, in vitro embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. *Animal Reproduction Science*. 2020; 217:106357. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106357>.
- Deguettes Q, Fattal E, Moreau M, Lego E, Bochot A. Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 590:119904. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119904.
- Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 1978; 9:17-26. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(78\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(78)90049-3).
- Forde N, Carter F, di Francesco S, Mehta JP, Garcia-Herreros M, Gad A, Tesfaye D, Hoelker M, Schellander K, Lonergan P. Endometrial response of beef heifers on day 7 following insemination to supraphysiological concentrations of progesterone associated with superovulation. *Physiological Genomics*. 2012; 44:1107. doi: 10.1152/physiolgenomics.00092.2012.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod*. 2009; 81:784-794. doi: 10.1095/biolreprod.108.074336.

- Gradela A, Esper CR, Rosa-e-Silva AA. Relationship between plasma 17-beta estradiol on the day of estrus and number of viable embryos in *Bos indicus* (Nellore) cows superovulated with FSH. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1994; 27:1663-1668. PMID: 7874034.
- Hirayama H, Kageyama S, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Minamihashi A. Prediction of superovulatory response in Japanese Black cattle using ultrasound, plasma anti-Mullerian hormone concentrations and polymorphism in the ionotropic glutamate receptor AMPA1/GRIA1. *The Journal of reproduction and development*. 2012; 58:380-383.doi: 10.1262/jrd.11-129s.
- Idrissi SJ, Le Bourhis D, Lefevre A, Emond P, Le Berre L, Desnoës O, Joly T, Buff S, Maillard V, Schibler L, Salvetti P, Elis S. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process. *Sci Rep*. 2021; 11:11618.doi: 10.1038/s41598-021-90870-8.
- Jaton C, Koeck A, Sargolzaei M, Malchiodi F, Price CA, Schenkel FS, Miglior F. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *J Dairy Sci*. 2016; 99:3612-3623.doi: 10.3168/jds.2015-10349.
- Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci*. 1997; 46:1-14.doi: 10.1016/s0378-4320(96)01589-8.
- Li C, Zhu YL, Xue JH, Zhang SL, Ma Z, Shi ZD. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex-sorted semen. *Theriogenology*. 2009; 71:1011-1017.doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.11.003.
- Lima WM, Vieira AD, Neto AT, Mezzalira A, Matos RC, Gregory RM. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal

- device. *Animal Reproduction Science*. 2007; 100:364-370.doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.023.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 2002; 42:601-611.doi: 10.1051/rnd:2002046.
- Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*. 1999; 57:23-33. doi: 10.1016/s0378-4320(99)00057-3.
- Matsuyama S, Sakaguchi Y, Kimura K. Relationship between plasma progesterone concentration and number of conceptuses and their growth in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 2012; 58:609-614.doi: 10.1262/jrd.2012-079.
- Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2019; 32:104-124.doi: 10.1071/RD19279.
- Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*. 2017; 88:84-88. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.052.
- Rasolomboahanginjatovo HS, Chorfi Y, Dupras R, Mills L, Lefebvre R. Effect of superovulation on uterine and serum biochemical parameters and its potential association with transferable embryos in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Science*. 2014; 15:273-281.doi: 10.4142/jvs.2014.15.2.273.
- Ratchamak R, Ratsiri T, Chumchai R, Boonkum W, Chankitisakul V. Relationship of the Temperature-Humidity Index (THI) with Ovarian Responses and Embryo Production in Superovulated Thai-Holstein Crossbreds under Tropical Climate Conditions. *Vet Sci*. 2021; 8. doi: 10.3390/vetsci8110270.
- Rico C, Fabre S, Médigue C, Clemente Nd, Clément F, Bontoux M, Touzé J-L, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers J-F, Monniaux D. Anti-Müllerian Hormone is an endocrine marker of

- ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction*. 2009; 80:50-59. doi: 10.1095/biolreprod.108.072157.
- Silva J, Alvarez R, Zanenga C, Pereira G. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim. Reprod*. 2009; 6:440-445.
- Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98:169-178. doi: 10.3168/jds.2014-8182.
- Sugimoto M, Sasaki S, Watanabe T, Nishimura S, Ideta A, Yamazaki M, Matsuda K, Yuzaki M, Sakimura K, Aoyagi Y, Sugimoto Y. Ionotropic glutamate receptor AMPA 1 is associated with ovulation rate. *PloS one*. 2010; 5:e13817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013817>.
- Tang KQ, Yang WC, Li SJ, Yang LG. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. *Genetics and molecular research : GMR*. 2013; 12:390-399. doi: 10.4238/2013.February.8.3.
- Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*. 2011; 129:7-13. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.10.013.
- Tsiligianni T, Amiridis GS, Vainas E. Activity of glycosidases (β -N-acetylglucosaminidase, α -mannosidase, and β -galactosidase) in the uterine luminal fluid of cows after multiple ovulation. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2007; 71:300-304. PMID: 17955905.
- Velazquez MA, Newman M, Christie MF, Cripps PJ, Crowe MA, Smith RF, Dobson H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*. 2005; 64:1977-1994. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.001.

- Vieira LM, Rodrigues CA, Mendanha MF, Sá Filho MF, Sales JNS, Souza AH, Santos JEP, Baruselli PS. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology*. 2014; 82:204-212. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.018>.
- Wiley C, Jahnke M, Redifer C, Gunn PJ, Dohlman T. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology*. 2019; 129:54-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.024.
- Wock J, Lyle L, Hockett M. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superovulation protocol on superovulatory response and embryo quality. (abstract). *Reprod Fertil Dev*. 2008; p. 20:228. doi: 10.1071/RDv20n1Ab297.
- Yang WC, Li SJ, Chen L, Yang LG. Polymorphism of the inhibin betaA gene and its relationship with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13:269-275. doi: 10.4238/2014.January.17.11.
- Yang WC, Li SJ, Tang KQ, Hua GH, Zhang CY, Yu JN, Han L, Yang LG. Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Anim Reprod Sci*. 2010; 119:172-177. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.02.004.
- Yang WC, Tang KQ, Li SJ, Chao LM, Yang LG. Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with superovulation traits. *Molecular biology reports*. 2012; 39:2481-2487. doi: 10.1007/s11033-011-0999-4.
- Yang WC, Yang LG, Riaz H, Tang KQ, Chen L, Li SJ. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. *Anim Reprod Sci*. 2013; 143:24-29. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.10.008.

Legendas das figuras

Figura 1: Número médio de estruturas totais, embriões transferíveis, taxa de não fecundados (NF), estruturas degeneradas e taxa de embriões sobre o total de estruturas obtidas em 6.174 coletas de embriões de diferentes raças. AN: Angus (n = 3.454); BN: Brangus (n = 883); BO: Braford (n = 793); CH: Charolês (n = 72); DE: Devon (n = 102); HO: Holandês (n = 221); KB: Kobe Beef (n = 189); MG: Murray Grey (n = 31); NE: Nelore (n = 26). As barras pretas representam a média geral.

Figura 2: Mediana e intervalo de confiança referentes às estruturas totais, proporção de não fecundados (NF), embriões degenerados e embriões transferíveis nas diferentes estações do ano: primavera (n = 2.473), verão (n = 891), outono (n = 1.320) e inverno (n = 1.518). *representa diferença estatística significativa ($P < 0,05$); #representa tendência ($0,1 < P < 0,05$) pelo teste não-paramétrico Kruskal–Wallis.

Figura 1.

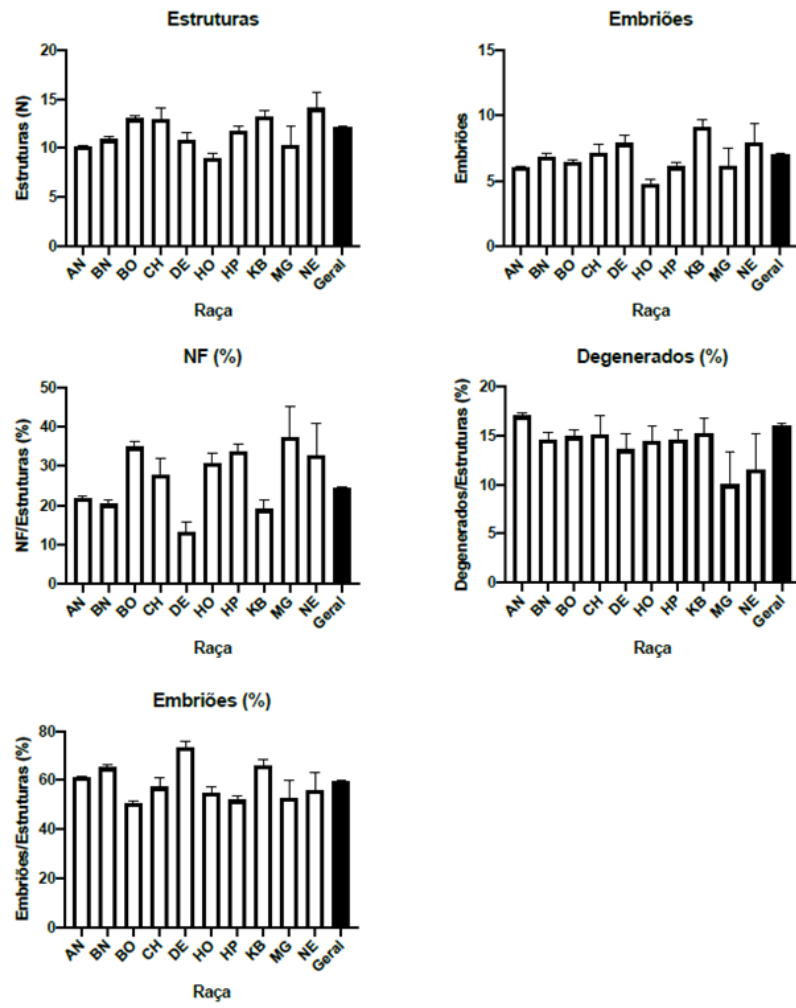
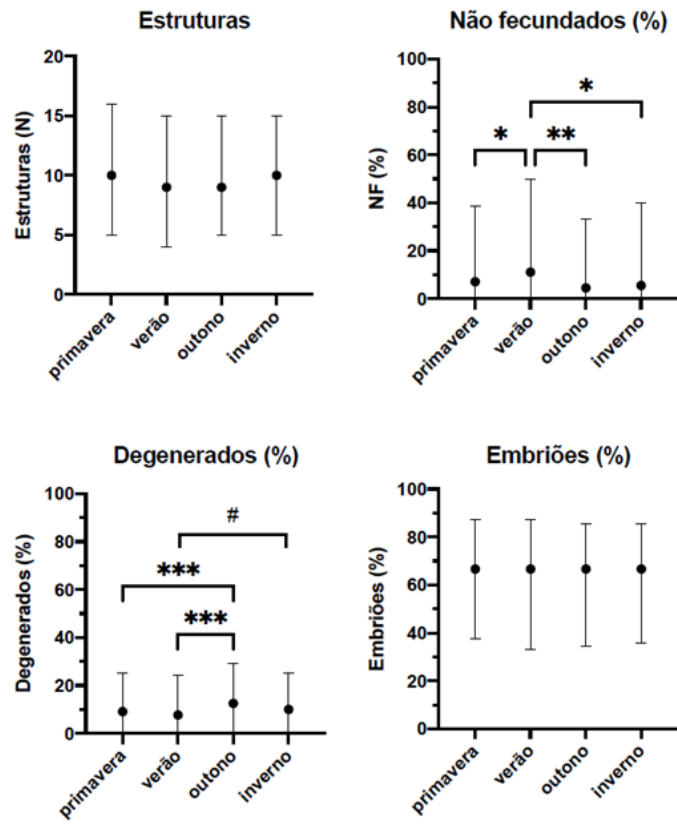


Figura 2.



3.2 Artigo 2

Concentração sérica de progesterona e sua relação com a produção de embriões de vacas de raças taurinas e sintéticas

Wagner Marques Lima, Rogério Ferreira, Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, Henrique Schneider Pestano, Monique Tomazele Rovani, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido à revista *Animal Reproduction Science*

Concentração sérica de progesterona e sua relação com a produção de embriões de vacas de raças taurinas e sintéticas

Wagner Marques Lima^{1,2}, Rogério Ferreira³, Rafael Gianella Mondadori¹, Arnaldo Diniz Vieira¹, Henrique Schneider Pestano¹, Monique Tomazele Rovani⁴, Bernardo Garziera Gasperin¹ *

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil.

²Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, Protásio Alves, RS, Brasil.

³Faculdade de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Endereço completo do autor correspondente:

E-mail: bernardo.gasperin@ufpel.edu.br

Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil.

Código Postal: 96160-000

Tel.: +55 53 3275 7188

Resumo

A relação entre o perfil endócrino e a resposta à superovulação (SOV) e produção embrionária não está completamente estabelecida. O objetivo do presente estudo foi investigar a relação entre concentrações de progesterona (P4) e resposta à SOV e produção de embriões em um protocolo estro base (EB). Ainda, avaliou-se o efeito da suplementação de P4 em doadoras de embriões durante o tratamento superovulatório. No primeiro estudo, vacas com menor concentração de P4 ($\leq 7,7$ ng/mL), apresentaram maior taxa de estruturas não fecundadas (NF;

$P < 0,05$). Por outro lado, vacas com concentração de P4 $> 7,7$ ng/mL no início do tratamento superovulatório apresentaram maior número de embriões e taxa de embriões/estruturas ($P < 0,05$). Em um segundo estudo, observou-se que a remoção, lavagem e reinserção de DIV no dia 4 (D4) do tratamento não altera a concentração sérica de P4. Finalmente, a suplementação de P4 com DIV contendo 1 g não afetou a produção embrionária de doadoras de raças taurinas ou sintéticas, embora tenha sido observado incremento na taxa de estruturas não fecundadas. Conclui-se que vacas doadoras com maior concentração de P4 endógena no início do tratamento com FSH apresentam maior taxa de fecundação e de produção embrionária. Embora os DIVs sejam eficientes em promover aumento nas concentrações de P4, a utilização de DIV contendo 1 g de P4 durante o tratamento com FSH não afeta a produção embrionária de doadoras taurinas e sintéticas.

Palavras-chave: Esteroides; Gonadotrofinas; Fêmeas bovinas.

1. Introdução

A biotécnica de indução de múltiplas ovulações (superovulação – SOV) e coleta de embriões em bovinos, conhecida como transferência de embriões (TE), tem contribuído significativamente no aumento da capacidade de obtenção de descendentes de fêmeas zootécnica/geneticamente superiores. Apesar de eficiente, a TE ainda apresenta limitações relacionadas à variabilidade na resposta ao tratamento de SOV, o que pode ser explicado por fatores como diferença na população folicular antral e fase do ciclo estral no momento da SOV (Bó et al., 2019), entre outros. Esta variação de resposta ao tratamento de SOV afeta o número de folículos ovulatórios e de embriões transferíveis, com consequente aumento de custo com a preparação de fêmeas receptoras.

Atualmente estão disponíveis duas metodologias de SOV, sendo que a primeira depende da identificação do momento do estro natural ou sincronizado para iniciar a aplicação de FSH

(estro base - SOV/EB) e a segunda dispensa esta condição por empregar hormônios para sincronizar o início de uma onda de crescimento folicular (SOV em tempo fixo – SOV/TF) (Bó et al., 2011). Os programas de SOV/TF tem como principal vantagem o fato de permitir uma maior programação de atividades das equipes de coleta, e alguns estudos sugerem que a resposta à SOV é equivalente à observada após a realização de SOV/EB (Bó et al., 1995; Bó et al., 1996). Independentemente do programa utilizado, sabe-se que a resposta é afetada negativamente quando a SOV é iniciada quando já existem folículos em processo de dominância. Nestes casos, a ablação folicular guiada por ultrassom (Baracaldo et al., 2000), ou por método manual (Lima et al., 2007), permite o contorno do problema. Porém, outros fatores individuais também são envolvidos na variabilidade de resposta à SOV, pois mesmo fêmeas submetidas a condições praticamente idênticas de ambiente e manejo, apresentam diferentes respostas.

O efeito do perfil endócrino sobre a produção e qualidade dos embriões não é totalmente conhecido. Nesse sentido, Wiley et al. (2019) realizaram um estudo comparando protocolos de SOV com progesterona (P4) baixa (<5 ng/mL) ou P4 alta (>6 ng/mL) utilizando apenas um dispositivo intravaginal de liberação de P4 (DIV) fora do diestro ou DIV com corpo lúteo (CL) ativo, respectivamente, durante a SOV. Os autores obtiveram um maior número de estruturas totais em vacas superovuladas com P4 alta em comparação com o grupo P4 baixa. Portanto, formulou-se a hipótese que baixas concentrações de P4 durante a SOV/EB estão associadas com maior proporção de estruturas não fecundadas e, conseqüentemente, menor produção embrionária, o que pode ser revertido utilizando suplementação de P4 intravaginal na complementação da atividade do CL.

Para fêmeas bovinas, aumento nas concentrações de P4 pode ser obtido mediante suplementação com P4/progestágenos por via oral, parenteral ou intravaginal, sendo que os DIVs possibilitam maior praticidade e controle das concentrações séricas, que variam de acordo com a dose de P4 no dispositivo. Ainda, é possível substituir o DIV durante o período de

tratamento (Iwazumi et al., 1994), ou utilizar dois dispositivos simultaneamente (Bisinotto et al., 2013). Entretanto, em todos os casos, observa-se que as concentrações séricas de P4 geralmente sobem rapidamente e, posteriormente, diminuem ao longo do período de manutenção dos DIV. Portanto, formulou-se a hipótese que esse efeito é decorrente do acúmulo de secreções sobre o DIV, o que reduz a liberação e absorção de P4.

O presente estudo tem por objetivos: 1) investigar se as concentrações de P4 durante a SOV afetam a produção embrionária; 2) determinar se a concentração de P4 no momento das inseminações artificiais afeta a taxa de fecundação em vacas superovuladas; 3) determinar se a remoção, lavagem e reinserção do DIV possibilita aumentar as concentrações séricas de P4; e 4) determinar se a suplementação de P4 com DIV durante a SOV repercute em melhora na produção embrionária.

2. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA-UFPel nº 57360).

2.1 Experimento 1

Utilizou-se 52 fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus x Bos indicus*, alojadas em um centro de produção comercial de embriões (Biotec Serviços de Apoio à Pecuária), localizado em Protásio Alves, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (28°40'38.30''S e 51°30'21.12''O), com temperatura média de 17,5°C e precipitação anual de 1.926 mm. O peso vivo dos animais variou entre 580 e 790 kg, com ECC entre 3 e 4,5 (escala de 1 a 5), sendo que todas foram mantidas em pastagem de Tifton-85, com acesso à água e sal mineralizado *ad libitum*. Estas doadoras foram pré-sincronizadas mediante a aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol (Bioestrogen, Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil) e inserção de um DIV contendo 1 g de P4 (Reproneo, GlobalGen, Jaboticabal, SP, Brasil) por 8 dias. Ao final deste período, administrou-

se 150 µg de D-Cloprostenol (Croniben, Biogénesis Bagó, Curitiba, PR, Brasil), considerando a ocorrência de estro base (EB), 48 h após. No intervalo entre 8 e 10 dias após o EB, realizou-se uma avaliação ginecológica (D0) a fim de detectar a presença de um CL e fazer a ablação de folículos > 8 mm (LIMA et al., 2007). No dia seguinte (D1), iniciou-se a SOV/EB (Figura 1) com a aplicação de oito doses decrescentes de FSH (Folltropin, Vetoquinol, Lavaltrie, QC, Canada), em intervalos de 12 h. As dosagens variaram de 120 a 300 mg, de acordo com a raça e qualidade da resposta obtida em tratamentos anteriores. Juntamente com a sexta e sétima doses de FSH, foi administrado 150µg de D-Cloprostenol para induzir a luteólise. Os animais foram monitorados para detecção do início do estro com intuito de realizar a aplicação de 50µg de Lecirelina (Tec-Relin, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil), análogo de GnRH para melhor sincronização das ovulações. Às 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH foram realizadas as inseminações artificiais (IA), seguindo os acasalamentos propostos pelos programas de melhoramento genético. A coleta dos embriões foi realizada seis dias após a segunda IA (D12), onde as vacas contidas em tronco apropriado, receberam anestesia epidural com 5 ml de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), higienização da região vulvar previamente a coleta pelo sistema fechado. Foi utilizado um cateter de RÜSCH (Teleflex, Perak, Malaysia) fixado no início do corpo uterino para irrigação simultânea dos cornos uterinos usando 1 L de solução de DMPBS (Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Ao final da coleta o conteúdo do filtro coletor (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), foi depositado em placa de Petri para a busca das estruturas com estéreo microscópio (SMZ-745, Nikon, São Paulo, Brasil). Após recuperadas, as estruturas foram transferidas para outra placa contendo meio de manutenção (Vigro, Vetoquinol, Lavaltrie, QC, Canada) para lavagem e classificação das estruturas. Neste momento, foram registrados dados referentes à resposta superovulatória (contagem de CL), número, estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas coletadas.

Coletas de sangue foram realizadas em diferentes momentos do protocolo: no D1 e D3 (aplicação de FSH), D5 e D6 (IAs) e na coleta dos embriões (D12).

As dosagens de P4 foram realizadas em laboratório privado pelo método de quimiluminescência (ADVIA Centaur Systems Progesterone Kit; Siemens; Ref. 01586287; sensibilidade de 0,21 ng/mL), com coeficientes de variação intra- e inter-ensaio inferiores a 10%.

2.2 Experimento 2

Foram utilizadas seis vacas Jersey imunocastradas não lactantes, alojadas no Centro Agropecuário da Palma (CAP) da UFPel (31°48'04.08" S - 52°30'58.89" O). O peso vivo dos animais variou de 420 e 509 kg, com ECC 3 (1 a 5), sendo que todas tiveram acesso a pastagem nativa e água *ad libitum*. A imunocastração foi obtida mediante aplicação de duas doses de 400 µg de GnRH-proteína conjugada anti-GnRH (Bopriva, Zoetis, Austrália) com intervalo de trinta dias. Duas semanas após a segunda dose, os animais foram submetidos à exame ultrassonográfico para confirmação da ausência de CL. Nesse momento, foi iniciado o tratamento (D0), com a inserção de um DIV com 1 g de P4 (Primer; Agener União, Brasil), dividindo as fêmeas aleatoriamente em dois grupos: Controle (n=3), animais com DIV mantido por 6,5 dias sem lavar; e grupo DIV lavado (n=3), animais que no D4 tiveram os DIVs momentaneamente retirados da vagina a fim de se fazer a remoção de muco mediante limpeza com escova e desinfetante a base de cloreto de alquil dimetil benzil amônio (CB30 TA; Ourofino Saúde Animal, Brasil). Foram realizadas coletas de sangue no D0, D2, D4, D5 e D6,5 para dosagem de P4, conforme descrito no Experimento 1.

2.3 Experimento 3

Vacas doadoras de embriões (n=105), alojadas na Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, foram submetidas ao protocolo SOV-EB, conforme descrito no Experimento 1, sendo alocadas em dois grupos: Controle (n=52), tratamento superovulatório convencional realizado apenas

com P4 luteal; e grupo P4 ($n=53$), tratamento superovulatório com suplementação de P4 obtida com a manutenção de um DIV com 1 g de P4 durante o período do D0 ao final do tratamento com FSH (D4). Os procedimentos de detecção de estro, indução da ovulação e IAs foram os mesmos descritos no Experimento 1. Coletas de sangue foram realizadas no D0, 24 a 36 h antes do início do tratamento com FSH; no início do tratamento com FSH (D2); e simultaneamente à penúltima aplicação de FSH e retirada dos DIVs (D5), para determinação das concentrações séricas de P4 (controle $n=34$; P4 $n=37$), conforme descrito anteriormente. No dia da coleta de embriões (D12), foram registrados dados referentes à resposta superovulatória (número de CL), número, estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas coletadas.

2.4 Análise estatística

Os dados de estruturas, porcentagem de estruturas não fecundadas, número de embriões e porcentagem de embriões foram comparados entre grupos pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. Dosagens de progesterona repetidas no tempo foram analisadas por modelos mistos, considerando grupo, dia e a interação grupo x dia como efeitos fixos e a vaca como unidade experimental de repetição. Diversas estruturas de covariância foram testadas para cada modelo e foi utilizado o que apresentou melhor Critério de Informação de Akaike (AIC). Variáveis contínuas não repetidas no tempo foram comparadas entre grupos por Teste F-Snedecor. A normalidade das variáveis contínuas e resíduos de cada modelo foi testada pelo teste de Shapiro–Wilk. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico JMP Pro (SAS Institute Inc.; Cary; NC; USA).

3. Resultados

3.1 Experimento 1

Foram realizadas avaliações das concentrações de P4 no D1, D3 e D12 do programa de SOV-EB. Foram observadas concentrações médias de $7,7\pm 0,5$, $7,8\pm 0,5$ e $23,6\pm 2,1$ ng/mL de

P4 em D1, D3 e D12, respectivamente. Observou-se uma correlação altamente significativa entre as concentrações de P4 em D1 e D3 ($P < 0,0001$; $R = 0,66$). Entretanto, não se observou correlação entre as concentrações de P4 durante a SOV e no dia da coleta de embriões ($P > 0,05$).

Nas vacas que apresentaram concentrações de P4 $> 7,7$ ng/mL no D1 da SOV-EB, observou-se menor taxa de estruturas não fecundadas, tendência a maior número de embriões e maior proporção de embriões em relação às estruturas totais ($P < 0,05$; Fig. 2). Entretanto, não foi observada relação significativa entre as concentrações de P4 no D3 e os dados de produção embrionária ($P > 0,05$); dados não demonstrados). Vacas com concentração de P4 acima de 23 ng/mL no dia da coleta de embriões (D12), apresentaram maior número de estruturas totais e maior número de embriões ($P < 0,05$), porém não houve relação da concentração de P4 com a taxa de não fecundados e de embriões/estruturas totais (Fig. 3).

Após a luteólise, no dia da administração de GnRH (D5), houve uma tendência ($P = 0,08$) de maior concentração de P4 nas vacas que apresentaram 100% de estruturas fecundadas no dia da coleta (D12). No dia das IAs (D6), não foi observada diferença na concentração de P4 nas vacas que apresentaram $\leq 10\%$ e $> 10\%$ de estruturas não fecundadas no D12 (Fig. 4).

3.2 Experimento 2

A hipótese de que a remoção do muco com lavagem dos implantes eleva as concentrações circulantes de P4 não foi confirmada em vacas imunocastradas. Como pode ser observado na Fig. 5, as concentrações séricas de P4 diminuíram após o dia quatro tanto nas vacas controle quanto nas vacas que tiveram os DIVs lavados e reinseridos.

3.3 Experimento 3

Conforme esperado, não foi observada diferença nas concentrações de P4 no dia da inserção dos DIV (D0; $P > 0,05$). No D2 e no D5, as vacas que receberam DIV contendo P4 apresentaram concentrações séricas de P4 superiores ($P < 0,05$; Fig. 6). A inserção de DIV

contendo P4 repercutiu em maior aumento nas concentrações de P4 entre D0 e D2, em comparação às vacas não tratadas ($P < 0,05$). Não foi observado efeito do tratamento com P4 no total de estruturas e proporção de degenerados (Fig. 7A e 7B, respectivamente). Entretanto, a inserção de DIV contendo P4 repercutiu em aumento na proporção de não fecundados (Fig. 7C; $P < 0,05$). A taxa de embriões, proporção de embriões qualidade 1 e número total de embriões não diferiu entre os grupos (Fig. 7D, 7E e 7F, respectivamente).

4. Discussão

Os principais achados do presente estudo foram: maiores concentrações de P4 durante o início das administrações de FSH no protocolo SOV/EB estão associadas com menor taxa de estruturas não fecundadas e maior proporção de embriões/estruturas recuperadas; 2) a concentração de P4 no momento do estro e da IA não tem relação com a taxa de fecundação em vacas superovuladas; 3) a remoção, lavagem e reinserção do DIV não repercute em aumento nas concentrações séricas de P4; e 4) a suplementação de P4 com DIV com 1 g de P4 durante a SOV/EB não afeta a produção embrionária.

Poucos estudos investigaram a relação entre o perfil endócrino da P4 e a produção embrionária em vacas superovuladas. Conforme esperado, observou-se correlação entre as concentrações de P4 em D1 e D3, uma vez que as vacas se encontravam entre os dias 9 e 11 do ciclo e, portanto, com CL funcional. Entretanto, não se observou correlação entre as concentrações de P4 durante a SOV e no dia da coleta de embriões, contrariando as observações de Goto et al. (1988), que realizaram SOV em vacas em fase aleatória do ciclo estral.

Nossos dados demonstram que vacas submetidas a SOV/EB, ou seja, sob P4 endógena, e que apresentam maiores concentrações de P4 ($>7,7$ ng/mL), no início do tratamento com FSH, apresentaram menor taxa de NF e maior relação embriões/estruturas. Isso poderia ser decorrente de uma maior qualidade dos ovócitos presentes em folículos que se desenvolvem sob altas

concentrações de P4, conforme revisado por Lonergan and Sánchez (2020). Em vacas Nelore superovuladas durante a primeira onda folicular, sob baixas concentrações de P4 (aproximadamente 1 ng/mL), foi observada adequada resposta à SOV, porém, houve um severo comprometimento na produção de embriões transferíveis ($0,2 \pm 0,4$ embriões), o que foi contornado com a utilização de DIV contendo P4 ($8 \pm 4,5$ embriões) (Nasser et al., 2011). Contrariando os dados observados no presente estudo, Wiley et al. (2019) obtiveram uma maior proporção de NF nas vacas submetidas à SOV com P4 alta (29%) em comparação com as P4 baixa (15%). Cabe ressaltar que os referidos autores compararam SOV realizada apenas com CIDR ou CIDR+CL e, portanto, as metodologias foram distintas.

No dia da coleta dos embriões, maiores concentrações de P4 foram observadas nas vacas que apresentaram maior número de estruturas, conforme observado por Goto et al. (1988). Curiosamente, no estudo de Wiley et al. (2019), embora tenha sido obtido o dobro de estruturas em vacas superovuladas sob P4 alta durante a SOV, não foi observada diferença nas concentrações de P4 no dia da coleta de embriões. No presente estudo, nas vacas que apresentaram maiores concentrações de P4, ou seja, aquelas que apresentaram maior resposta à SOV e, conseqüentemente, maior número de estruturas, não foi observada diferença na proporção de NF. Embora Wiley et al. (2019) não tenham observado diferença significativa nas concentrações de P4 no dia da coleta de embriões, as vacas que apresentaram maior número de estruturas totais, apresentaram mais NF. Nossos dados não suportam a hipótese de que a maior resposta à SOV está associada a uma menor eficiência na fecundação.

É bem estabelecido que as concentrações de P4 devem permanecer basais durante o estro e no momento da IA, para que se obtenha fecundação adequada. Vacas holandesas, sincronizadas ou não, submetidas à IA, e que não se tornaram gestantes, apresentaram maior concentração de P4 no dia da IA (Ambrose et al., 2015). Portanto, formulou-se a hipótese que a luteinização prematura, possivelmente induzida por resíduos de LH presentes nas formulações

de FSH purificadas, ou por concentrações relativamente baixas de P4 ao final do tratamento com FSH, poderiam explicar baixas taxas de fecundação, o que não foi confirmado.

Em um segundo momento, investigamos uma possibilidade para manter as concentrações de P4 de DIVs elevadas ao longo do tratamento, uma vez que se observa uma redução nas concentrações séricas de P4 no período final de manutenção dos DIVs, mesmo quando utilizados 2 CIDR (3,8 g de P4) simultaneamente (Bisinotto et al., 2013). A hipótese de que a lavagem dos DIVs poderia facilitar a absorção de P4, elevando as concentrações séricas, não foi confirmada. Portanto, uma vez que, com base no experimento 1, o principal foco seria uma elevação nas concentrações de P4 séricas no início da SOV, optou-se por utilizar apenas um DIV com 1 g de P4 para suplementação de vacas doadoras, considerando que já possuíam CL viável.

Os dados do Experimento 1 sugerem que a suplementação de P4 no início do protocolo de SOV poderia contornar a menor taxa de fecundação, que pode ser decorrente da ovulação de ovócitos de baixa viabilidade e/ou reinício da meiose antecipado (Lonergan and Sánchez, 2020). Portanto, testou-se o efeito da suplementação de P4 com DIV sobre a produção embrionária. A inserção de DIV contendo P4 repercutiu em maior aumento nas concentrações de P4 entre D0 e D2, bem como maiores concentrações séricas em D2 e D5, em comparação às vacas não tratadas. Apesar do tratamento ter sido eficiente em elevar as concentrações de P4 durante a SOV, não foi observado nenhum efeito significativo na produção embrionária, apenas aumento na taxa de não fecundados no grupo P4. Wiley et al. (2019), comparando protocolos de SOV com P4 baixa (<5ng/mL) ou alta (>6 ng/mL) utilizando apenas um CIDR ou CIDR+CL durante a SOV, obtiveram maior número de estruturas totais em vacas superovuladas com P4 alta (19,3) em comparação com o grupo P4 baixa (10,7). Embora os estudos tenham utilizado metodologias diferentes, nosso estudo não suporta a hipótese que a suplementação de P4 favoreça a produção embrionária de vacas submetidas à SOV/EB.

5. Conclusão

Menores concentrações de progesterona durante a SOV/EB estão associadas com uma maior proporção de estruturas não fecundadas. As concentrações de P4 no dia do estro e IA não estão relacionadas com a taxa de fecundação nas vacas submetidas à SOV/EB. A suplementação de P4 com um DIV em vacas submetidas a SOV/EB não beneficia a produção embrionária.

Financiamento

BGG recebeu financiamento do CNPq (#310932/2021-1) e FAPERGS (#21/2551-0002278-7).

Declaração de conflito de interesse

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Referências

- Ambrose, D.J., Gobikrushanth, M., Zuidhof, S., Kastelic, J.P., 2015. Low-dose natural prostaglandin F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. *Theriogenology*. 83, p.529-34. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.034.
- Baracaldo, M.I., Martinez M.F., Adams G.P., Mapletoft R.J., 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 53, 1239-50. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00268-5.
- Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Martinez, N., Greco, L.F, Barbosa, L.F.S.P., Bueno, P.P., Scagion, L.F.S., Thatcher, W.W, Santos, J.E.P., 2013. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *Journal of Dairy Science*. 96, 2214-2225. doi: 10.3168/jds.2012-6038.

- Bó, G.A., Cedeño, A., Mapletoft, R.J., 2019. Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*. 16, 411-422. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0042.
- Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*. 43, 31-40. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00010-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00010-R).
- Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*. 45, 897-910. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00020-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00020-9).
- Bó, G.A., Peres, L.C., Cutaia, L.E., Pincinato, D., Baruselli, P.S., Mapletoft, R.J., 2011. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *J Reproduction, Fertility and Development*. 24, 272-277. doi: 10.1071/RD11918.
- Goto, K., Ohkutsu, S., Nakanishi, Y., Ogawa, K., Tasaki, M., Ohta, H., Inohae, S., Tateyama, S., Kawabata, T., Ishii, S., Miyamoto, A., Furusawa, T., Umezu, M., Masaki, J., 1988. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. *Theriogenology*. 29, 615-29. [10.1016/s0093-691x\(88\)80009-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(88)80009-8).
- Iwazumi, Y., Fukui, Y., Vargas, R.B., Nakano, C., Sato, N., Furudate, M., Ohsaki, K., Matsuzaki, S., 1994. Superovulation Using CIDR in Holstein Cows. *Journal of Reproduction and Development*. 40, 259-266. <https://doi.org/10.1262/jrd.40.259>.
- Lima, W.M., Vieira, A.D., Neto, A.T., Mezzalira, A., Matos, R.C., Gregory, R.M., 2007. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Anim Reprod Sci*. 100, 364-70. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.023.

Lonergan, P., Sánchez, J.M., 2020. Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. *Journal of Dairy Science*. 103, 8698-8707. 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18583>.

Nasser, L.F., Sá Filho, M.F.D., Reis, E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 76, 320–327. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.009.

Wiley, C., Jahnke, M., Redifer, C., Gunn, P.J., Dohlman, T., 2019. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology*. 129, 54-60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.024.

Legendas:

Figura 1- Protocolo de superovulação iniciado a partir de estro-base, aplicado em vacas doadoras de embriões (n = 52). Estro-base nove a onze dias antes do início da SOV. D0 = ablação folicular; FSH = Hormônio folículo-estimulante aplicado de manhã e à tarde (as doses de FSH variam de acordo com a doadora); PGF = Prostaglandina F2alfa; IA = inseminação artificial; GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas. *Vacas que manifestaram estro pela manhã do D5 receberam GnRH pela manhã, as demais receberam GnRH no D5 à tarde. IA: Cada doadora foi inseminada duas vezes, 12 e 24 h após administração de GnRH.

Figura 2- Concentração de progesterona (P4) sérica em relação ao total de estruturas, taxa de não fecundados (NF), número de embriões e taxa de embriões em relação as estruturas totais (Emb/Est) no dia um (D1) do protocolo de superovulação, iniciado 9 a 11 dias após o estro base. Nos gráficos estão representados a mediana e o intervalo de confiança.

Figura 3 - Concentração de progesterona (P4) sérica em relação ao total de estruturas, taxa de não fecundados (NF), número de embriões e taxa de embriões em relação as estruturas totais (Emb/Est) no dia doze (D12) do protocolo de superovulação, iniciado 9 a 11 dias após o estro base. Nos gráficos estão representados a mediana e o intervalo de confiança.

Figura 4 – Relação entre taxa de fecundação e concentração de progesterona após a luteólise, no dia da administração de GnRH (A) e no dia das inseminações (B) em vacas superovuladas. A) As vacas foram separadas de acordo com a taxa de estruturas fecundadas (F) ou não fecundadas (NF) (100%F; n = 13 e >35%NF; n = 13). B) As vacas foram separadas de acordo com a taxa de não fecundados ($\leq 10\%$ NF; n = 28 e $>10\%$ NF; n = 23).

Figura 5 – Concentração de progesterona (P4) sérica em vacas imunocastradas tratadas com dispositivos intravaginais (DIV) contendo 1 g de P4 no D0, mantidos por 6,5 dias. As vacas do grupo controle (n = 3) permaneceram com os DIV sem lavar enquanto as vacas do grupo lavado (n = 3) tiveram os DIVs temporariamente removidos para limpeza e reinserção no dia quatro (D4).

Figura 6 – Concentração de progesterona sérica em vacas submetidas à superovulação iniciada 9 a 11 dias após estro base, não tratadas ou tratadas com DIV contendo P4. As vacas do grupo controle (n = 34) não foram suplementadas, enquanto as vacas do grupo P4 (n = 37) receberam dispositivos intravaginais contendo 1 g de P4 durante o período de tratamento com FSH. D0: dia da avaliação ginecológica; D2 início da aplicação de FSH; D5: remoção do dispositivo intravaginal.

Figura 7 – Produção embrionária em vacas submetidas à superovulação iniciada 9 a 11 dias após estro base, não tratadas (cont) ou tratadas com DIV contendo 1g de progesterona (P4). As vacas do grupo controle (n = 52) não foram suplementadas com progesterona (P4), enquanto as vacas do grupo P4 (n = 53) receberam dispositivos intravaginais contendo 1 g de P4 durante o período de tratamento com FSH.

Figura 1-

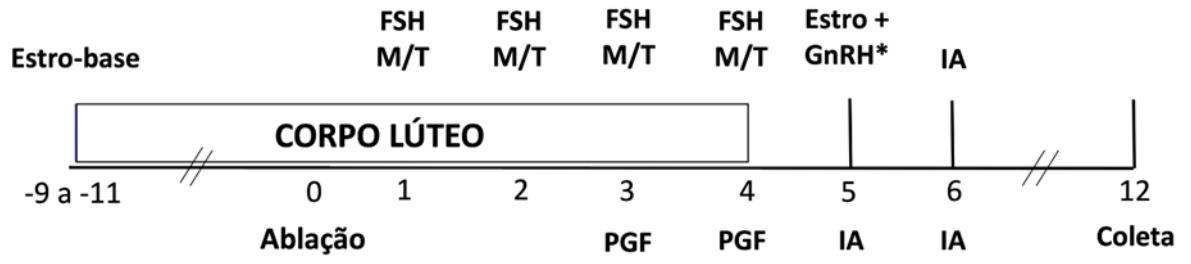


Figura 2-

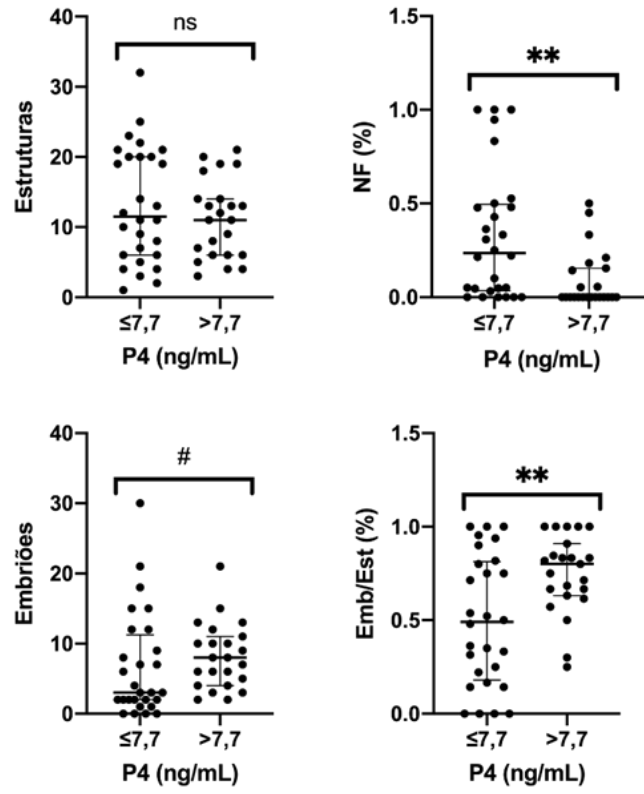


Figura 3-

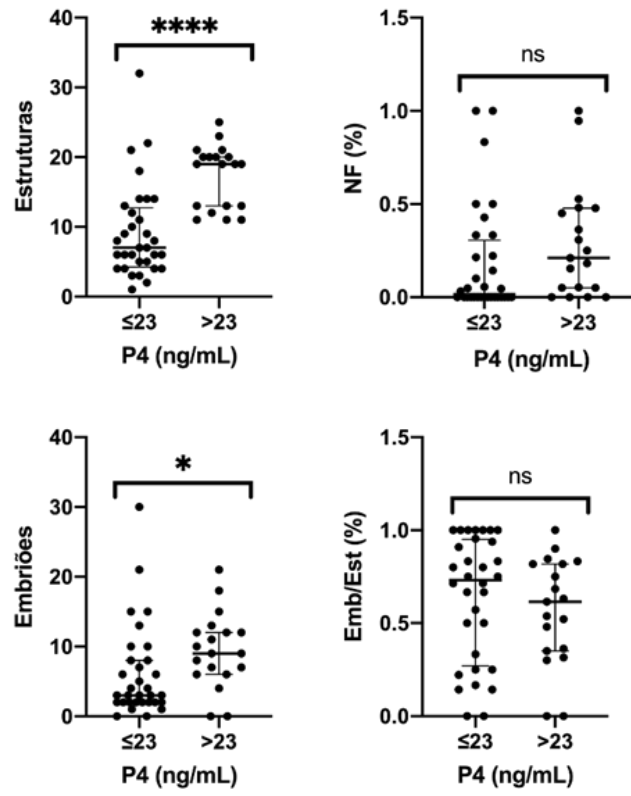


Figura 4-

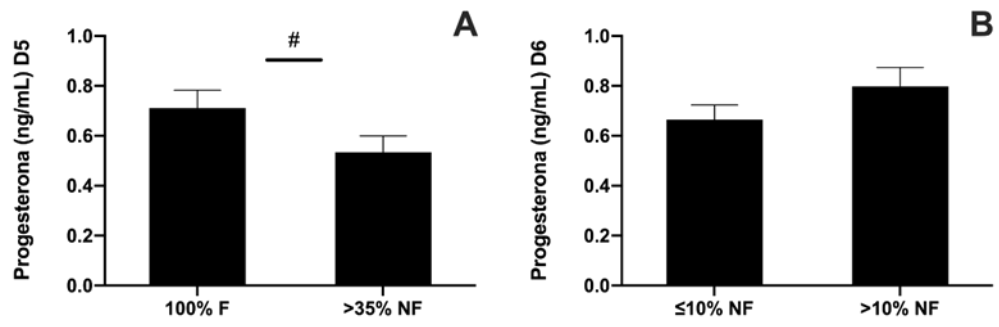


Figura 5-

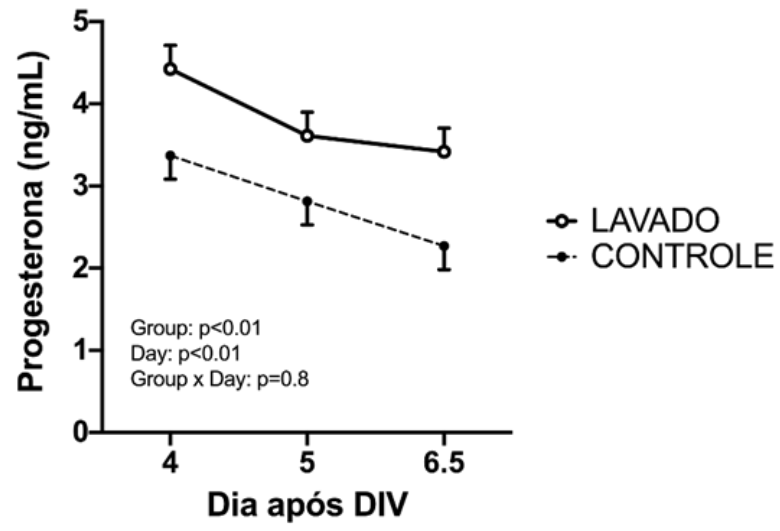


Figura 6-

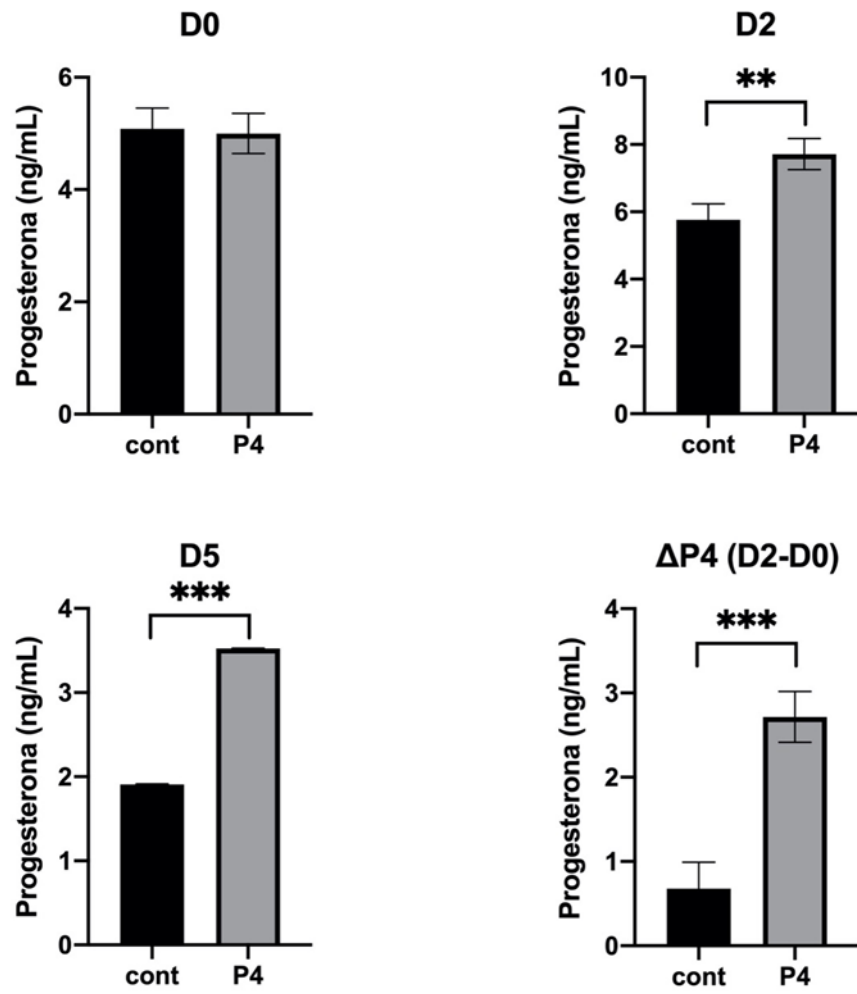
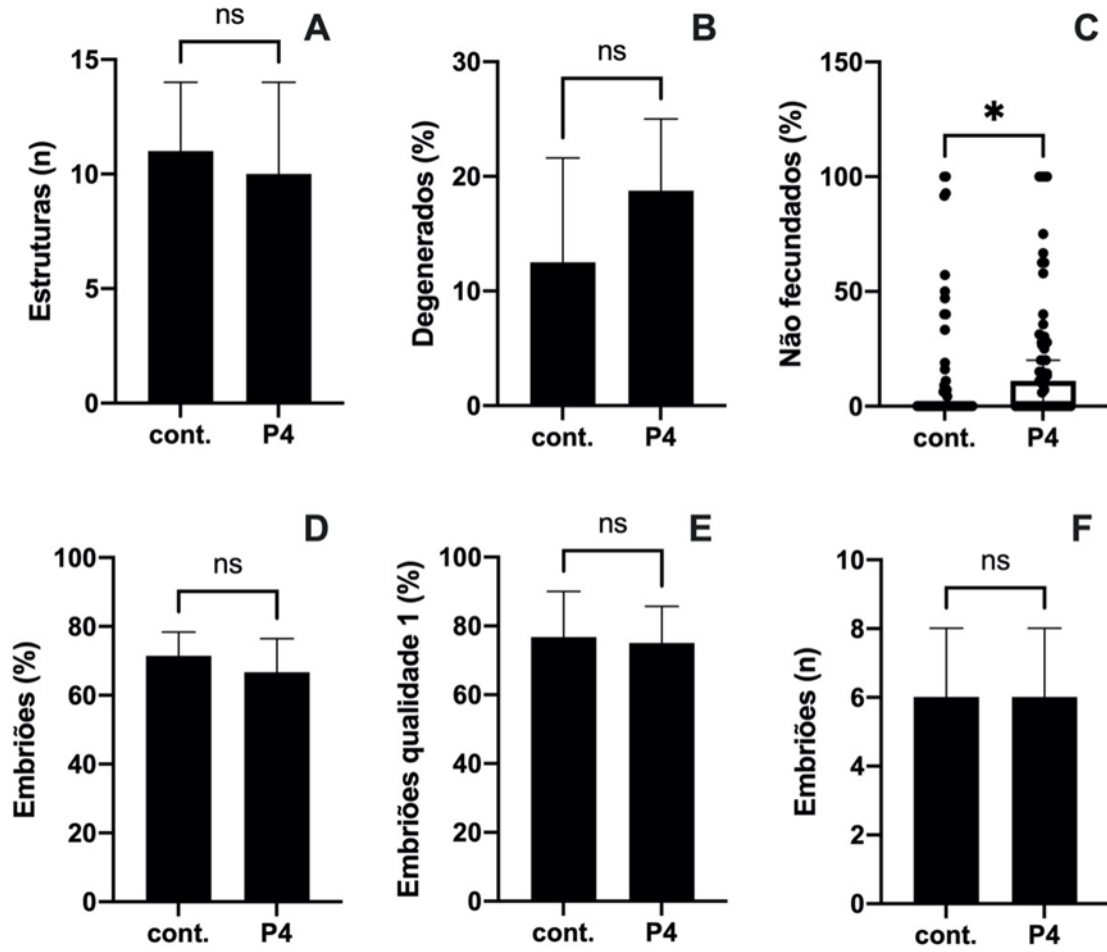


Figura 7-



3.3 Artigo 3

Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer?

Wagner Marques Lima, Fabiane Pereira de Moraes, Rogério Ferreira, Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, Nathália Wacholz Knabah, Danylo Cintra Medeiros Lima, Monique Tomazele Rovani, Luiz Francisco Machado Pfeifer, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Bernardo Garziera Gasperin

Publicado na revista Animal Reproduction

Short Communication

Running title: EC and GnRH for ovulation induction in TET

Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer?

Wagner Marques Lima^{1,2} (<http://orcid.org/0000-0003-0753-1325>), Fabiane Pereira de Moraes¹ (<https://orcid.org/0000-0003-2502-4108>), Rogério Ferreira³ (<https://orcid.org/0000-0003-1349-7821>), Rafael Gianella Mondadori¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0578-8469>), Arnaldo Diniz Vieira¹ (0000-0001-6410-2354), Nathália Wacholz Knabah² (0000-0002-6536-2227), Danylo Cintra Medeiros Lima² (<http://orcid.org/0000-0002-9606-0520>), Monique Tomazele Rovani⁴ (<https://orcid.org/0000-0001-8257-3635>), Luiz Francisco Machado Pfeifer⁵ (<https://orcid.org/0000-0003-2069-951X>), Paulo Bayard Dias Gonçalves⁶ (<https://orcid.org/0000-0002-0671-1466>), Bernardo Garziera Gasperin^{1*} (<https://orcid.org/0000-0002-3715-2345>)

¹ Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil

² Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, Protásio Alves, RS, Brasil

³ Faculdade de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

⁵ Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, Brasil

⁶ Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil

*Corresponding author: Bernardo Garziera Gasperin, bernardo.gasperin@ufpel.edu.br, Graduate Program in Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil, código postal: 96160-000, tel.: +55 53 3275 7188

Abstract

Estradiol cypionate (EC) or GnRH have been widely used for ovulation induction in timed embryo transfer (TET). EC administration increases the proportion of cows that show estrus, whereas GnRH promotes more synchronized ovulations. The aim of the present study was to evaluate the potential beneficial effects of combining EC and GnRH in TET. In experiment 1, no difference was observed on serum progesterone concentrations on Day 6 and 13 after GnRH treatment between GnRH and EC+GnRH groups. In experiment 2, pregnancy per embryo transfer (P/ET) did not differ ($p = 0.69$) between GnRH (62.8%) and EC+GnRH (58.7%) groups. In conclusion, combining EC and GnRH for ovulation induction does not increase progesterone secretion and pregnancy rate after TET in cattle.

Keywords: Gestation, Luteal function, Progesterone, Synchronization.

Introduction

In Brazil, there are several alternatives for ovulation induction in cows, including estradiol benzoate (EB), estradiol cypionate (EC) and GnRH. Although EC has been widely used at progesterone device withdrawal, eliminating the need for animal handling before timed artificial insemination (TAI), there is greater variation in the time of ovulation compared to GnRH treatment (Souza et al., 2009). In contrast, administering estradiol at proestrus regulates endometrial gene expression (Sá Filho et al., 2017) and increases the proportion of cows that show estrus (Pfeifer et al., 2020), which are more likely to become pregnant after TAI (Barbosa et al., 2022) or TET (Frade et al., 2014).

Previous studies have compared different treatments for ovulation induction in cows submitted to TAI, as reviewed by Consentini et al. (2021). However, to our knowledge, there is no study evaluating the effect of combining the potential beneficial effects of EC and GnRH in timed embryo transfer (TET). The aim of the present study was to evaluate the effect of

combining EC and GnRH for ovulation induction on luteal function and pregnancy rate after TET in cows.

Methods

All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas (CEEA-UFPel #57360).

2.1 Experiment 1

Non-pregnant, non-lactating, Jersey and Holstein cows (n=12) were submitted to a hormonal protocol, based on the insertion of a progesterone (P4) intravaginal device (IVD) (1 g, Primer, Agener União) and an intramuscular (i.m.) injection of 2 mg EB (Agener União) on Day - 11 (D-11). On D - 4, i.m. injections of 482 µg of cloprostenol sodium (Estron, Agener União) and 300 IU eCG (SincroeCG; Ourofino) were administered. On D -2, the IVDs were removed, and half of the cows (n=6) received an i.m. injection of 0.6 mg EC (ECP, Zoetis). On Day 0, all the cows received an i.m. injection of GnRH analog (10 µg buserelin acetate; Sincroforte, Ourofino), and the ovary of the pre-ovulatory follicle was determined by ultrasound. On Days 6 and 13 after GnRH, the animals were submitted to ultrasound to verify the presence of a corpus luteum (CL), where the pre-ovulatory follicle was previously located, and blood samples were collected for progesterone assay. Progesterone data were analyzed by paired Student's T test, using cow as subject.

2.2 Experiment 2

This experiment was performed in two replicates. Non-pregnant, suckling crossbred Angus cows (n=184), between 35 and 80 days postpartum and with body condition score (BCS) 3 to 4 (scale 1 to 5) were submitted to a hormonal protocol. On Day -10, the cows received an IVD containing 1 g of P4 (Reproneo, GlobalGen) and an i.m. injection of 2 mg EB (Bioestrogen; Biogénesis Bagó). On Day -2, 150 µg of d-cloprostenol (Croniben, Biogénesis

Bagó), 400 IU of eCG (Ecegon; Biogénesis Bagó) were administered i.m. and the IVDs were removed, and half of the cows (n=92) received an i.m. injection of 0.6 mg EC (Cipiotec, Agener União). On Day 0, all the cows received an i.m. injection of GnRH analog (10 µg buserelin acetate - Gonaxal, Biogénesis Bagó). On Day 7, cows with a CL and without reproductive disorders received a single fresh or thawed *in vivo* produced embryo (grade 1 or 2; morula or initial blastocyst) in the uterine horn ipsilateral to the CL. The embryo transfers were conducted in a commercial farm, and the embryos were collected from 21 donor cows, which were mated with 11 bulls, selected by the owner. Fifty-six days after embryo transfer, pregnancy diagnosis was performed through transrectal ultrasonography. Pregnancy data were analyzed by logistic regression including group, replicate and embryo type (fresh or thawed) as fixed effects.

Results

3.1 Experiment 1

Two cows from each group did not ovulate and were excluded from the trial. There was no significant difference ($p = 0.09$) between GnRH and EC+GnRH groups in progesterone concentration on Days 6 and 13 after GnRH treatment (Figure 1). Cows from EC+GnRH had larger CL diameter ($p < 0.05$) compared to GnRH group (Figure 1).

3.2 Experiment 2

The recipient utilization rates (83.1%) did not differ ($p = 0.55$) between GnRH (84.8%) and EC+GnRH (81.5%) (Table 1). Pregnancy per embryo transfer (P/ET) rate did not differ between groups when fresh or thawed embryos were transferred ($p = 0.46$; Figure 2). Although significant difference was observed in P/ET rate between replicates ($p = 0.002$), there was no difference between groups ($p = 0.69$; Figure 2).

Discussion

Our results show that combining EC and GnRH for ovulation induction does not affect progesterone synthesis and pregnancy rate after TET. To our knowledge, this is the first study evaluating potential effects of combining EC and GnRH for synchronizing embryo recipients. The lack of difference on progesterone concentrations was expected because a previous study in dairy cows demonstrated that both EC and GnRH are efficient in inducing ovulation (Souza et al., 2009). Furthermore, both groups received GnRH treatment, which promotes more synchronized ovulations compared to EC alone (Barbosa et al., 2022).

Our results are in agreement with a previous study that compared EC, EC+GnRH or GnRH for ovulation induction in a progesterone-estradiol based protocol, which also did not observe differences in pregnancy rate on days 31 and 60 after TAI, reviewed by Consentini et al. (2021). It is well established that EC administration induces estrous behavior (Pfeifer et al., 2020) and that recipient cows that show estrus are more likely to become pregnant (Frade et al., 2014; Bó and Cedeño, 2018). Although estrus detection was not performed in the present study, treatment with EC had no beneficial effect on the percentage of cows that received an embryo and on pregnancy rate. The recipient utilization rates for both groups were above 80%, which are similar to the rates reported in other studies (Mora et al., 2020). It is noteworthy that, regardless of the group, P/ET rates were close to 60%, which indicates the high quality of the *in vivo* produced embryos and the high fertility of the recipient cows used in the study (Hasler, 2014; Bó and Cedeño, 2018). Further studies are necessary to investigate potential effects of EC in cows under challenging circumstances, with low BCS, since these cows are less likely to show natural estrus (Pfeifer et al., 2021) and, consequently, more likely to benefit from EC treatment.

Conclusion

Combining EC and GnRH for ovulation induction does not increase progesterone secretion and pregnancy rate after TET in cattle.

Author contributions

WML and BGG: Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing; RF, LFMP and MTR: Data curation, Formal analysis; FPM, ADV and RGM: Methodology, Writing – review & editing; NWK, WML and DCML: Methodology, Investigation; BGG and PBDG: Conceptualization, Project administration, Supervision, Funding acquisition.

Data availability statement

Data are available upon request.

Conflicts of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Financial support

PBDG received funding for this research from FAPERGS and CNPq (grant number #16/2551-0000494-3) and FAPERGS (grant number #22/2551-0000391-5). BGG received funding for this research from CNPq (grant numbers #424308/2018–5 and #310932/2021-1). PBDG and BGG received funding from Capes (grant numbers #001).

References

- Barbosa, IP, Cestaro, JP, Silva, SA, Noletto, GS, Gonçalves, RL, Silva, GM, Paes, FH, Gasperin, BG, Rovani, MT, Pfeifer, LFM. GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows. *Theriogenology*. 2022; 179:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.014>. PMID:34823056.
- Bó, GA, Cedeño, A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. *Anim. Reprod*. 2018;15:224-230. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0060>. PMID: 34178145.
- Consentini, CEC, Wiltbank, MC, Sartori, R. Factors That Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds with an Emphasis on Timed Artificial Insemination Programs. *Animals (Basel)*. 2021;11:301. <https://doi.org/10.3390/ani11020301>. PMID: 33503935.
- Frade, MC, Frade, C, Cordeiro, MB, Sá Filh, MF, Mesquita, FS, Nogueira GP, Binelli, M, Membrive, CM. Manifestation of estrous behavior and subsequent progesterone concentration at timed-embryo transfer in cattle are positively associated with pregnancy success of recipients. *Anim Reprod Sci*. 2014;151:85-90. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.005>. PMID:25449549.
- Hasler, JF. 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*. 2014;81:152-169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>. PMID:24274419.
- Mora, AP, Correa, JCS, Torres, JAP. Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of México. *Anim Reprod*. 2020;17:e20200007. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0007>. PMID: 32714459.
- Pfeifer, LFM, Moreira, EM, da Silva, GM, de Souza, VL, Nunes, VRR, Andrade, JS, Neves, PMA, Ferreira, R. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed

artificially inseminated beef cows. *Livestock Science*. 2020;231:103886.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103886>.

Pfeifer, LFM, Rodrigues, WB, Nogueira, E. Relationship between body condition score index and fertility in beef cows subjected to timed artificial insemination. *Livestock Science*. 2021;248:104482. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104482>.

Sá Filho, MF, Gonella-Diaza, AM, Sponchiado, M, Mendanha, MF, Pugliesi, G, Ramos, RDS, Andrade, SCS., Gasparin, G, Coutinho, LL, Goissis, MD, Mesquita, FS, Baruselli, PS, Binelli, M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017;8:79-79. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0211-3>. PMID: 29118976.

Souza, AH, Viechnieski, S, Lima, FA, Silva, FF, Araújo, R, Bó, GA, Wiltbank, MC, Baruselli, PS. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*. 2009;72:10-21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>. PMID: 19269685.

Table 1. Recipient utilization rates and pregnancy rates according to each treatment.

| Farm | Group | TOTAL | ET | %ET | Pregnant | P/ET | P/TOTAL |
|---------|---------|-------|----|------|----------|------|---------|
| Farm 1 | EC+GnRH | 43 | 36 | 83.7 | 26 | 72.2 | 60.5 |
| | GnRH | 43 | 38 | 88.4 | 28 | 73.7 | 65.1 |
| Farm 2 | EC+GnRH | 49 | 39 | 79.6 | 18 | 46.2 | 36.7 |
| | GnRH | 49 | 40 | 81.6 | 21 | 52.5 | 42.9 |
| Overall | EC+GnRH | 92 | 75 | 81.5 | 44 | 58.7 | 47.8 |
| | GnRH | 92 | 78 | 84.8 | 49 | 62.8 | 53.3 |

ET: embryo transfer; %ET: recipient utilization rate; P/ET: pregnancy per embryo transfer; P/TOTAL: total pregnancy rate.

Figure legends:

Figure 1. (A) Serum progesterone concentration and (B) Corpus Luteum (CL) diameter in cows treated with GnRH or EC+GnRH for ovulation induction. Estradiol cypionate (EC) was administered at intravaginal device withdrawal in cows from EC+GnRH group, whereas GnRH treatment was performed 48 h later in both groups.

Figure 2. (A) Pregnancy rates according to embryo source (fresh or frozen thawed) and (B) replicate for GnRH and EC+GnRH groups. Estradiol cypionate (EC) was administered at intravaginal device withdrawal in cows from EC+GnRH group, whereas GnRH treatment was performed 48 h later in both groups. Rep = replicate; ns = $p > 0.05$.

Figure 1.

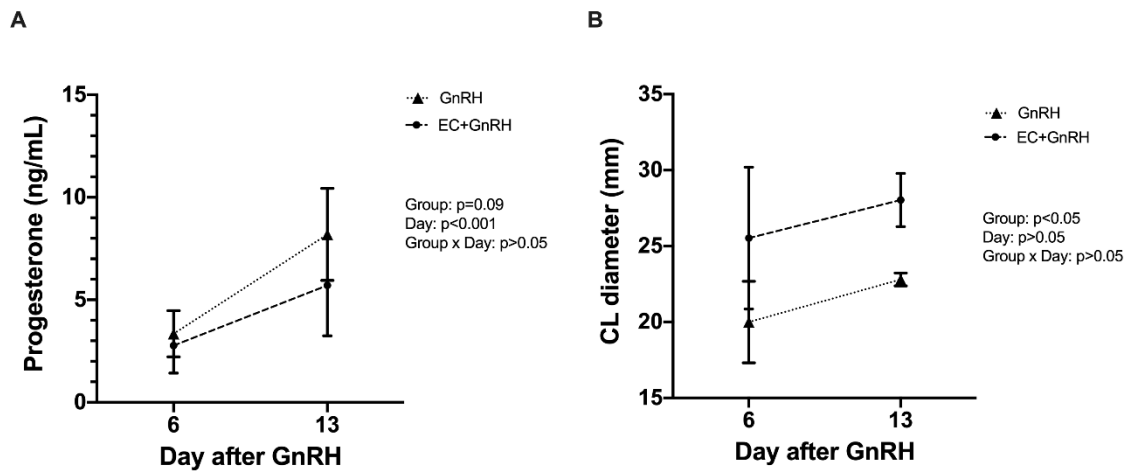
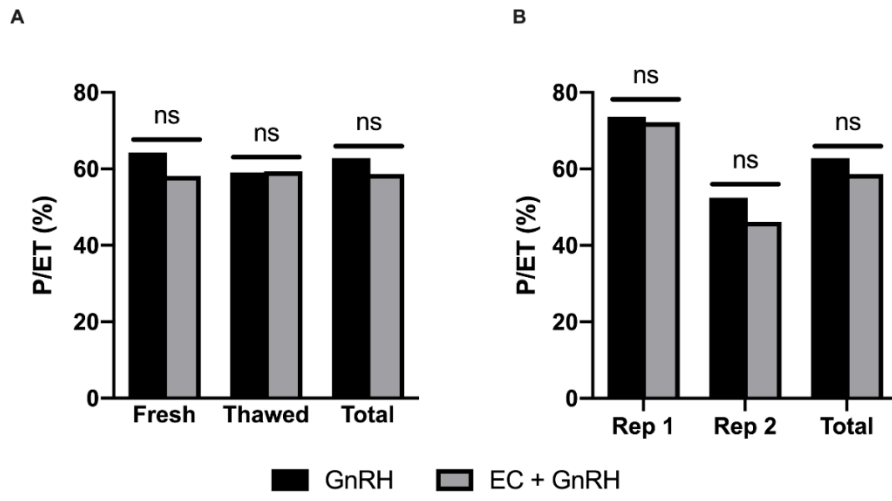


Figure 2.



4 Considerações Finais

Diversos estudos identificaram potenciais marcadores em genes relacionados ao desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, sendo que alguns polimorfismos parecem explicar, em parte, a variação na resposta à SOV em doadoras de embriões. Nesse contexto, técnicas modernas de sequenciamento genômico poderão contribuir significativamente no entendimento da influência gênica sobre a resposta à SOV. No presente momento, a literatura demonstra que as concentrações séricas de AMH representam o melhor marcador para prever o potencial de resposta à SOV. O seu uso isolado ou, principalmente, associado a outros marcadores ou ferramentas auxiliares, como a ultrassonografia, facilitará a identificação de doadoras com maior potencial para produção de embriões. Porém, deve-se atentar ao mérito genético do animal, mesmo que este se mostre um excelente doador nestes exames.

Com base em nossos dados, pode-se concluir que a composição genética e a época do ano influenciam a resposta das vacas a SOV e a produção embrionária. Além disso, recomenda-se realizar melhorias ambientais, para aumentar o conforto térmico e diminuir a flutuação sazonal da nutrição o que poderiam melhorar a produção de embriões.

Em relação ao perfil hormonal das doadoras, embora tenhamos observado que maiores concentrações de P4 endógeno no início da SOV/EB resulta em menores taxas de não fecundados e maior proporção de embriões/estruturas coletadas, a sua suplementação não trouxe benefício à produção embrionária. O uso de um DIV de 1 g de P4 durante a SOV/EB foi eficiente para o aumento das concentrações séricas durante as aplicações de FSH no período de diestro, assim, novos estudos antecipando a suplementação de P4 em relação às aplicações de FSH poderiam apresentar resultados diferentes aos aqui obtidos.

A respeito da sincronização de receptoras de embrião, a combinação de CE e GnRH para indução da ovulação não afeta a síntese de progesterona e a taxa de prenhez após a TETF. Por outro lado, neste estudo não realizamos a observação de estro e é sabido que o CE induz sua manifestação e que receptoras que o manifestam tem maior probabilidade de engravidar assim, um novo estudo seria interessante para

avaliar o quanto este fator pode contribuir nos resultados da TETF dependendo das características do grupo a ser trabalhado.

Referências

ABDEL AZIZ, R. L.; KHALIL, A. A. Y.; ABDEL-WAHAB, A.; HASSAN, N. Y.; ABDEL-HAMIED, E.; KASIMANICKAM, R. K. Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. **Theriogenology**, v.100, p.72-79, 2017.

AMARAL, C. S.; KOCH, J.; CORREA JÚNIOR, E. E.; BERTOLIN, K.; MUJICA, L. K. S.; FIORENZA, M. F.; ROSA, S. G.; NOGUEIRA, C. W.; COMIM, F. V.; PORTELA, V. V. M.; GONÇALVES, P. B. D.; ANTONIAZZI, A. Q. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.87, p.899-909, 2020.

AMBROSE, D. J.; GOBIKRUSHANTH, M.; ZUIDHOF, S.; KASTELIC, J. P. Low-dose natural prostaglandin F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. **Theriogenology**, v.83, n.4, p.529-34, 2015.

BARACALDO, M. I.; MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1239-1250, 2000.

BARBOSA, I. P.; CESTARO, J. P.; SILVA, S. A.; NOLETO, G. S.; GONÇALVES, R. L.; SILVA, G. M.; . . . PFEIFER, L. F. M. GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows. **Theriogenology**, v.179, p.1-6, 2022.

BATISTA, E. O.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N.; RENNÓ, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.448-452, 2014.

BERGFELT, D. R.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.1-12, 1997.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; MARTINEZ, N.; GRECO, L. F.; BARBOSA, L. F. S. P.; BUENO, P.P.; SCAGION, L. F. S.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.4, p.2214-2225, 2013.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.31-40, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v.45, p.897-910, 1996.

BÓ, G. A.; PERES, L. C.; CUTAIA, L. E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Journal Reproduction, Fertility and Development**, v.24, n.1, p.272-277, 2011.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.81, p.38-48, 2014.

BÓ, G. A. & CEDEÑO, A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. **Animal Reproduction**, v.15, p. 224-230, 2018.

BÓ, G. A.; CEDEÑO, A.; MAPLETOFT, R. J. Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. **Animal Reproduction**, v.16, p.411-422, 2019.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.1115-1128, 1996.

BRITT J. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **The Bovine Practitioner Proceeding**, v.24, p.39-43, 1991.

CARVALHO, B.; VARAGO, F.; RUAS, J.; VARGAS, M.; SANTOS, G.; SILVA, A. Embryo production in zebu cows after superovulation with two commercial formulations of gonadotropin. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, p.155-159, 2013.

CARVALHO, J. B.; CARVALHO, N. A.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-175, 2008.

CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L.; ROBALO SILVA, J. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.1-8, 2002.

CONSENTINI, C. E. C.; WILTBANK, M. C. & SARTORI, R. Factors That Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds with an Emphasis on Timed Artificial Insemination Programs. **Animals (Basel)**, v.11, n.2, p.301, 2021.

CORY, A. T.; PRICE, C. A.; LEFEBVRE, R.; PALIN, M. F. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. **Animal genetics**, v.44, p.197-201, 2013.

DE VASCONCELOS, G. L.; DA CUNHA, E. V.; MACULAN, R.; SÁNCHEZ VIAFARA, J. A.; BARBALHO SILVA, A. W.; SOUZA BATISTA, A. L.; VIANA SILVA, J. R.; DE SOUZA, J. C. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, in vitro embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.217, p.106357, 2020.

DEGUETTES, Q.; FATTAL, E.; MOREAU, M.; LEGO, E.; BOCHOT, A. Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. **International Journal of Pharmaceutics**, v.590, p.119904, 2020.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v.9, p.17-26, 1978.

FORDE, N.; CARTER, F.; DI FRANCESCO, S.; MEHTA, J. P.; GARCIA-HERREROS, M.; GAD, A.; TEFAYE, D.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. Endometrial response of beef heifers on day 7 following insemination to supraphysiological concentrations of progesterone associated with superovulation. **Physiological Genomics**, v.44, p.1107, 2012.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of Reproduction**, v.81, p.784-794, 2009.

GOTO, K.; OHKUTSU, S.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, H.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S.; KAWABATA, T.; ISHII, S.; MIYAMOTO, A.; FURUSAWA, T.; UMEZU, M.; MASAKI, J. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black cattle. **Theriogenology**, v.29, n.3, p.615-29, 1988.

GRADELA, A.; ESPER, C. R.; ROSA-E-SILVA, A. A. Relationship between plasma 17-beta estradiol on the day of estrus and number of viable embryos in *Bos indicus* (Nellore) cows superovulated with FSH. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1663-1668, 1994.

HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; NAITO, A.; FUKUDA, S.; FUJII, T.; MINAMIHASHI, A. Prediction of superovulatory response in Japanese Black cattle using ultrasound, plasma anti-Mullerian hormone concentrations and polymorphism in the ionotropic glutamate receptor AMPA1/GRIA1. **The Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.380-383, 2012.

IDRISSI, S. J.; LE BOURHIS, D.; LEFEVRE, A.; EMOND, P.; LE BERRE, L.; DESNOËS, O.; JOLY, T.; BUFF, S.; MAILLARD, V.; SCHIBLER, L.; SALVETTI, P.; ELIS, S. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process. **Scientific Reports**, v.11, p.11618, 2021.

IWAZUMI, Y.; FUKUI, Y.; VARGAS, R. B.; NAKANO, C.; SATO, N.; FURUDATE, M.; OHSAKI, K. and MATSUZAK, S. Superovulation Using CIDR in Holstein Cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.40, p.259-266, 1994.

JATON, C.; KOECK, A.; SARGOLZAEI, M.; MALCHIODI, F.; PRICE, C. A.; SCHENKEL, F. S.; MIGLIOR, F. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.3612-3623, 2016.

KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. **Animal Reproduction Science**, v.46, p.1-14, 1997.

LI, C.; ZHU, Y. L.; XUE, J. H.; ZHANG, S. L.; MA, Z.; SHI, Z. D. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex-sorted semen. **Theriogenology**, v.71, p.1011-1017, 2009.

LIMA, W. M.; VIEIRA, A. D.; NETO, A. T.; MEZZALIRA, A.; MATOS, R. C.; GREGORY, R. M. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.364-370, 2007.

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

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.23-33, 1999.

MATSUYAMA, S.; SAKAGUCHI, Y.; KIMURA, K. Relationship between plasma progesterone concentration and number of conceptuses and their growth in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.609-614, 2012.

MIKKOLA, M.; HASLER, J. F.; TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, p.104-124, 2019.

MIKKOLA, M.; TAPONEN, J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. **Theriogenology**, v.88, p.84-88, 2017.

NASSER, L.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; REZENDE, C.R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. 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.

PFEIFER, L. F. M.; MOREIRA, E. M.; DA SILVA, G. M.; DE SOUZA, V. L.; NUNES, V. R. R.; ANDRADE, J. D. S.; FERREIRA, R. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed artificially inseminated beef cows. **Livestock Science**, v.231, p.103886, 2020.

- RASOLOMBOAHANGINJATOVO, H. S.; CHORFI, Y.; DUPRAS, R.; MILLS, L.; LEFEBVRE, R. Effect of superovulation on uterine and serum biochemical parameters and its potential association with transferable embryos in Holstein dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, v.15, p.273-281, 2014.
- RATCHAMAK, R.; RATSIRI, T.; CHUMCHAI, R.; BOONKUM, W.; CHANKITISAKUL, V. Relationship of the Temperature-Humidity Index (THI) with Ovarian Responses and Embryo Production in Superovulated Thai-Holstein Crossbreds under Tropical Climate Conditions. **Veterinary Sciences**, v.8, n.11, p.270, 2021.
- RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; CLEMENTE, N. D.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZÉ, J-L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; RÉMY, B.; BECKERS, J-F.; MONNIAUX, D. Anti-Müllerian Hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biology of Reproduction**, v.80, p.50-59, 2009.
- SÁ FILHO, M. F. D.; GONELLA-DIAZA, A. M.; SPONCHIADO, M.; MENDANHA, M. F.; PUGLIESI, G.; RAMOS, R. D. S.; . . . BINELLI, M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8, p.79-79, 2017.
- SILVA, J.; ALVAREZ, R.; ZANENGA, C.; PEREIRA, G. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. **Animal Reproduction**, v.6, p.440-445, 2009.
- SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; ROZNER, A. E.; VIEIRA, L. M.; HACKBART, K. S.; BENDER, R. W.; DRESCH, A. R.; VERSTEGEN, J. P.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.169-178, 2015.
- SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, n.1, p.10-21, 2009.
- SUGIMOTO, M.; SASAKI, S.; WATANABE, T.; NISHIMURA, S.; IDETA, A.; YAMAZAKI, M.; MATSUDA, K.; YUZAKI, M.; SAKIMURA, K.; AOYAGI, Y.; SUGIMOTO, Y. Ionotropic glutamate receptor AMPA 1 is associated with ovulation rate. **PLoS one**, v.5, n.11, p. e13817, 2010.
- TANG, K. Q.; YANG, W. C.; LI, S. J.; YANG, L. G. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.390-399, 2013.
- TRÍBULO, A.; ROGAN, D.; TRIBULO, H.; TRIBULO, 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.

TSILIGIANNI, T.; AMIRIDIS, G. S.; VAINAS, E. Activity of glycosidases (β -N-acetylglucosaminidase, α -mannosidase, and β -galactosidase) in the uterine luminal fluid of cows after multiple ovulation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.300-304, 2007.

VELAZQUEZ, M. A.; NEWMAN, M.; CHRISTIE, M. F.; CRIPPS, P. J.; CROWE, M. A.; SMITH, R. F.; DOBSON, H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, v.64, p.1977-1994, 2005.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; MENDANHA, M. F.; SÁ FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; SANTOS, J. E. P.; BARUSELLI, P. S. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, v.82, p.204-212, 2014.

WILEY, C.; JAHNKE, M.; REDIFER, C.; GUNN, P. J.; DOHLMAN, T. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. **Theriogenology**, v.129, p.54-60, 2019.

WOCK, J.; LYLE, L.; HOCKETT, M. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superovulation protocol on superovulatory response and embryo quality. (abstract). **Reproduction, Fertility and Development**, p. 20-228, 2008.

YANG, W. C.; LI, S. J.; CHEN, L.; YANG, L. G. Polymorphism of the inhibin betaA gene and its relationship with superovulation traits in Chinese Holstein cows. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.269-275, 2014.

YANG, W. C.; LI, S. J.; TANG, K. Q.; HUA, G. H.; ZHANG, C. Y.; YU, J. N.; HAN, L.; YANG, L. G. Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.172-177, 2010.

YANG, W. C.; TANG, K. Q.; LI, S. J.; CHAO, L. M.; YANG, L. G. Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with superovulation traits. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.2481-2487, 2012.

YANG, W. C.; YANG, L. G.; RIAZ, H.; TANG, K. Q.; CHEN, L.; LI, S. J. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v.143, p.24-29, 2013.

Anexos

1ª página:

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
14/2019/CEEA/REITORIA
23110.057360/2018-79

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Marcadores endócrinos, genéticos e moleculares relacionados à resposta a superovulação e qualidade embrionária em bovinos**”, processo nº 23110.057360/2018-19, sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 16/04/2019.

Finalidade (X) Pesquisa () Ensino

Vigência da 17/04/2019 a 30/12/2022
autorização

Espécie/linhagem/raça Bovinos/Holandês, Angus, Hereford, Braford e Brangus

Nº de animais 668

Idade 2 a 8 anos

Sexo Fêmeas

Origem Biotec Biotecnologia em Reprodução Animal. Linha Zona Porta, 4570 – Protásio Alves – RS

Código para cadastro nº CEEA 57360-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 17/04/2019, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0509745 e o código CRC B0EF698B.

Referência: Processo nº 23110.057360/2018-79

SEI nº 0509745

Criado por 00246127074, versão 2 por 00246127074 em 17/04/2019 14:37:36.