

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR E TAXA DE
OVULAÇÃO DE VACAS *BOS INDICUS* APÓS APLICAÇÃO
CONSECUTIVA DE 8 DOSES DE eCG**

BHÁRBARA DELBONI STUHR

VILA VELHA
MARÇO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR E TAXA DE OVULAÇÃO DE
VACAS *BOS INDICUS* APÓS APLICAÇÃO CONSECUTIVA DE 8 DOSES
DE eCG**

**Dissertação Apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré requisito do Programa de
Pós graduação em Ciência
Animal, para Obtenção do
grau de mestre em ciência
animal.**

BHÁRBARA DELBONI STUHR

VILA VELHA
MARÇO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S796a Stuhr, Bárbara Delboni.
Avaliação da dinâmica folicular e taxa de ovulação de vacas
Bos Indicus após aplicação consecutiva de 8 doses de eGG /
Bárbara Delboni Stühr. – 2016.
43 f.: il.

Orientadora: Bárbara Loureiro.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Vila Velha, 2016.
Universidade de Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Bovinos – Inseminação artificial. 2. Bovino – Fecundidade.
I. Loureiro, Bárbara. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.208245

BHÁRBARA DELBONI STUHR

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR E TAXA DE OVULAÇÃO DE
VACAS BOS INDICUS APÓS APLICAÇÃO CONSECUTIVA DE 8
DOSES DE eCG**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 01 de março de 2016,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Mauricio Gomes Favoreto (UVV)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Tadokoro (UVV)



Profa. Dra. Bárbara Loureiro (UVV)

Orientadora

DEDICO...

Á meu avô George (*in memorian*) sempre presente em meus pensamentos e
coração...

Pelo sublime e forte sentimento de “sonho de infância”!

A você minha homenagem eterna...

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível devido a ajuda de muitas pessoas.

A todos vocês manifesto meus agradecimentos:

A Deus sempre presente em minha vida. Por ter iluminado meu caminho até aqui e por ter me abençoado com a presença de pessoas tão especiais;

Aos meus pais, Sergio e Silene, minha base, que estão comigo nos momentos alegres e tristes e me ensinaram a lutar pelos meus sonhos de forma honesta.

Fundamentais para que eu alcançasse mais essa vitória. Meus eternos agradecimentos;

À minha irmã Bruna por sempre me enxergar muito mais do que eu sou e ao meu irmão Franz por sempre me ajudar no meio informático (o que seria de mim sem essa ajuda...);

À toda minha família, por me darem forças sem fim e acreditarem em mim;

À minha orientadora, Prof. Dra. Barbara Loureiro, por todo aprendizado e principalmente por não desistir de mim;

Ao meu tio Erasmo, semeador da minha profissão, me apoiando mais uma vez em outro experimento. Obrigada por confiar em mim;

Ao meu grande eterno amigo, Isaac Santos Gil, que desde a graduação vem me acompanhando, não medindo esforços para me ajudar em tudo. Obrigada pela amizade tão sincera;

Ao Paroxo, que mais uma vez, também se dedicou para ajudar a tornar esse experimento real;

À minha segunda família, amigos irmãos do “Jambalaya”, que nos momentos de desespero me fizeram sorrir com um simples gesto de carinho;

À família e amigos “Agrounião”, pelo relacionamento de confiança e apoio que também possibilitaram essa conquista;

Aos meus amigos Jo e Joabe, que mesmo fora da área, me incentivaram, torceram por mim e compreenderam da melhor maneira possível minha ausência;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Vila Velha pela transmissão de conhecimentos;

À Médica Veterinária mestranda Tracy Lacerda pela ajuda na tradução deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1	16
1 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1.Ciclo estral e dinâmica ovariana	16
1.2 <i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i>	18
1.3 Inseminação artificial em tempo fixo	19
1.4 Gonadotrofina Coriônica Equina	20
1.5 Resposta imunológica	22
1.6 Resposta imunológica contra eCG	23
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2	30
ABSTRACT	31
RESUMO	32
INTRODUCTION	32
MATERIAL AND METHODS	34
RESULTS	35
DISCUSSION	39
CONCLUSION	41
REFERENCES	41

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Estrus synchronization protocol and ultrasound evaluation in bos indicus cows. Cows in the control group did not receive eCG on Day 9 35

Figure 2 - Antral follicle count on Day 4 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 1.5 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 37

Figure 3 - Antral follicle count on Day 10 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 7 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 37

Figure 4 - Size of the largest follicle (mm) measured on Day 10 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 7 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 38

Figure 5 - Corpus luteum diameter (mm) measured on Day 18 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol

(approximately 7 days after the presumable ovulation) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 38

Figure 6 - Percentage of cows ovulating in control and eCG treated groups after an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 39

Figure 7 - Percentage of cows ovulating per replicate in control and eCG treated groups after an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$ 39

LISTA DE ABREVIATURAS

BE benzoato de estradiol

CL Corpo Lúteo

D0 dia zero

D4 dia quatro

D7 dia sete

D9 dia nove

D10 dia dez

D18 dia dezoito

ECC escore de condição corporal

eCG Gonadotrofina Coriônica Equina

ECP cipionato de estradiol

E2 estrogênio

FD folículo dominante

FSH hormônio folículo estimulante

GnRH hormônio liberador de gonadotropina

IA inseminação artificial

IATF inseminação artificial em tempo fixo

LH hormônio luteinizante

MHC complexo de histocompatibilidade principal

P nível de significância

P4 progesterona

SNC sistema nervosa central

US ultrassonografia

RESUMO

STUHR, Bhárbara Delboni. Universidade Vila Velha – ES, março de 2016. **AVALIAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR E TAXA DE OVULAÇÃO DE VACAS *BOS INDICUS* APÓS APLICAÇÃO CONSECUTIVA DE 8 DOSES DE eCG.** Orientador: Barbara Loureiro.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é uma glicoproteína produzida nos cálices endometriais da égua prenha entre 40 a 130 dias de gestação. Em bovinos, é utilizada em associação com os protocolos hormonais de sincronização do estro. Por ter função de FSH e LH, o eCG cria condições de crescimento folicular e ovulação, tornando os animais mais responsivos a onda de LH. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento dos folículos antrais, diâmetro do folículo pré-ovulatório e corpo lúteo (CL) e taxa de ovulação em vacas *bos indicus* submetidas a um protocolo de sincronização do estro em associação com eCG por oito vezes consecutivas. Dez vacas de corte, cíclicas, múltíparas, solteiras e criadas a pasto foram divididas em dois grupos: grupo controle (n = 5) e grupo eCG (n = 5). Em um intervalo de 30 dias, os animais foram submetidas a um mesmo protocolo, totalizando 8 re-sincronizações. No dia 0 receberam um implante intravaginal de progesterona e aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE). No dia 7, os animais receberam 500 mg de cloprostenol de sódio. No dia 9, o implante foi removido e 0,6 mg de cipionato de estradiol foi aplicado, as vacas do grupo de tratamento receberam também 300 UI de eCG. Para avaliação dos folículos ovarianos e corpo lúteo, foram realizados exames ultrassonográficos nos dias 4, 10 e 18 do protocolo de sincronização. No dia 4 do protocolo (aproximadamente 1,5 dias após o recrutamento folicular) para contar folículos antrais, no dia 10, contar folículos antrais e medir o tamanho do maior folículo e no dia 18 para medir o diâmetro do CL. Todos os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SAS (SAS 9.2, North Carolina, USA). Não foi encontrada diferença significativa no número de folículos antrais e o tamanho do folículo pré ovulatório entre os grupos. No entanto, as vacas que foram tratadas com eCG tinham um maior (P < 0.05) CL e aumentaram (P < 0.05) a

taxa de ovulação (18 mm e 92%, respectivamente) quando comparadas com o grupo controle (14,1 mm e 80%, respectivamente). Além disso, os tratamentos consecutivos com eCG não afetaram o CL nem as taxas de ovulação. Em conclusão, o tratamento com eCG aumentou o tamanho do CL e taxa de ovulação, mesmo depois de 8 tratamentos consecutivos.

PALAVRAS-CHAVE: corpo lúteo, fertilidade, imunidade, IATF

ABSTRACT

STUHR, Bhárbara Delboni. University Vila Velha - ES February, march de 2016. **EVALUATION OF FOLLICLER DYNAMICS AND OVULATION RATE IN *BOS INDICUS* COWS AFTER CONSECUTIVE APPLICATION OF 8 DOSES OF eCG.** Advisor: Barbara Loureiro.

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is a glycoprotein produced in the endometrial calices of the mare between 40 and 130 days of gestation. In bovine, it is used in association with hormonal estrus synchronization protocols. Due to having FSH and LH functions, eCG creates conditions for follicular growth and ovulation, making the animals more responsive to the LH surge. Thus, this study aimed to evaluate antral follicle growth, pre-ovulatory follicle and CL diameter and ovulation rate in bos indicus cows submitted to an estrus synchronization protocol in association with eCG for eight times consecutively. Ten cyclical, multiparous, single and pasture raised beef cows were divided into two groups: control group (n = 5) and eCG group (n = 5). In 30 day interval, the animals were synchronized with the same protocol, totalizing 8 re-synchronizations. On day 0 animals received an intravaginal progesterone implant and 2 mg of estradiol benzoate (EB). On day 7, animals received 500 mg of sodium cloprostenol. On day 9, the implant was removed and 0.6 mg of estradiol cypionate was applied, the cows in the treatment group also received 300 IU of eCG. For evaluation of the follicles and corpus luteum ultrasound examinations were performed on days 4, 10, and 18 of the synchronization protocol. On Day 4 of the protocol (approximately 1.5 days after follicle recruitment) to count antral follicles, on Day 10, to count antral follicles and to measure the size of the largest follicle and on Day 18 to measure the diameter of the CL. All data were analyzed using the SAS statistical software (SAS 9.2, North Carolina, USA). No significant difference between follicular growth and size of the pre-ovulatory follicle was found between groups. However, cows that were treated with eCG had a larger ($P < 0.05$) CL and increased ($P < 0.05$) ovulation rate (18 mm and 92%, respectively) when compared with the control group (14.1 mm and 80%, respectively). Furthermore, consecutive treatments

with eCG did not affect CL or ovulation rates. In conclusion, eCG treatment increased CL size and ovulation rate even after 8 consecutive treatments.

KEY WORDS: corpus luteum, eCG, fertility, immunity, FTAI.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos foram observados importantes avanços tecnológicos na pecuária os quais indicam a necessidade de um rebanho mais lucrativo, ou seja, com altas taxas de fertilidade procurando programas que maximizem o número de bezerros nascidos dentro de uma propriedade (CARRIJO JUNIOR & LANGER, 2006).

Desta forma, para que um rebanho atinja seu máximo desempenho reprodutivo é necessária a produção de um bezerro/vaca/ano. Levando em consideração que o período de gestação de uma vaca é de 280 dias, para atingir esses valores a vaca terá que conceber com 80-85 dias pós-parto (BARUSELLI et al., 2004).

Atualmente pesquisadores de todo o mundo vêm pesquisando o uso de protocolos hormonais que sincronizam a ovulação possibilitando o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Visto que a perda do cio aumenta o número de dias improdutivos do animal e o intervalo entre parto e diminui o número de bezerros nascidos, o uso desses protocolos dispensa a detecção de cio, aumentando desta forma a eficiência do uso da inseminação artificial (CARRIJO JUNIOR & LANGER, 2006).

Ainda nesse contexto, o cenário nacional de produção in vitro de embriões está em constante crescimento, o Brasil aparece em posição de destaque atingindo 50% da produção total de embriões produzidos mundialmente. Com o intuito da utilização maximizada dessa biotecnologia, estudos também estão sendo desenvolvidos para aumentar a produção de embriões com boa qualidade, conseqüentemente, aumentando também a taxa de gestação e o número de indivíduos nascidos (VARAGO et al., 2008).

Nos protocolos de IATF, a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) é utilizada para a maturação folicular e sincronização da ovulação, sendo indicado para fêmeas recém paridas, animais com baixo escore de condição corporal e ainda para fêmeas que não estejam ciclando (BÓ et al., 2004; BARUSELLI et al., 2004).

A Gonadotrofina Coriônica Equina é uma molécula de glicoproteína hormonal produzida nos cálices endometriais da égua prenha entre os 40 e 130 dias de gestação. Este possui ação biológica de hormônio luteinizante (LH) e

hormônio folículo estimulante (FSH) sendo dominante a ação do FSH, a qual estimula o desenvolvimento de folículos ovarianos. Comercialmente, o eCG foi umas das primeiras gonadotrofinas utilizadas também para a indução de superovulação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Todavia, por ter uma origem heteróloga, um alto peso molecular, um elevado nível de glicosilação e uma meia vida longa, o eCG torna-se uma molécula potencialmente imunogênica quando aplicada em bovinos (DRION et al., 2001). Assim sendo, os animais que passam por sucessivos tratamentos com eCG parecem se tornar refratários a essa molécula (BARUSELLI et al., 2008), não respondendo ao tratamento (DRION et al., 2001).

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Ciclo Estral e Dinâmica Ovariana

O ciclo reprodutivo sofre ação de vários fatores como: puberdade, ciclo estral, estação de monta, atividade sexual pós-parto e envelhecimento. Todos esses fatores ainda são influenciados por elementos ambientais, genéticos, fisiológicos, hormonais, comportamentais e psicossociais (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O controle do ciclo estral é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o qual envolve a secreção de vários hormônios controlados pelos mecanismos feedback positivo ou negativo (FERREIRA, 2010).

O hipotálamo é uma área especializada do sistema nervoso central que produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH é liberado pelo hipotálamo de duas maneiras: duração contínua caracterizada por pequenos pulsos e em alta amplitude e alta frequência sendo sensitivo a um feedback positivo do estrogênio (E₂). A primeira favorece a secreção do FSH pela hipófise, enquanto a segunda favorece a secreção do LH (FERREIRA, 2010).

A hipófise está localizada logo abaixo do hipotálamo sendo constituída por duas partes: adenohipofise (onde é produzido o FSH e o LH) e a neurohipófise (onde é armazenada a ocitocina) (FERREIRA, 2010).

As gonadotrofinas atuam em conjunto no crescimento folicular (FERREIRA, 2010). Para que ocorra efetivamente a sincronização da emergência folicular é preciso que ocorra inibição da secreção do FSH e do LH com conseqüente pico de FSH para indução sincrônica de uma nova onda folicular (BARUSELLI et al., 2010).

O LH atua no ovário estimulando a ovulação, a formação do corpo lúteo (CL) e a secreção de progesterona (P₄). Sob ação das gonadotrofinas, o folículo produz o estrogênio e o CL produz a progesterona (FERREIRA, 2010). O CL produz a P₄ do quarto ao décimo dia do ciclo estral em condições crescentes até que ocorra a luteólise, entre o 15^o e o 20^o dia (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O estrógeno atua no SNC induzindo o comportamento de fêmea, potencializa os efeitos da ocitocina na contração uterina, induz o pico pré-ovulatório de LH na ovulação, dentre outras funções. Já a progesterona atua bloqueando a secreção de GNRH, inibe a motilidade uterina e inibe o cio e o pico pré ovulatório de LH, prepara o endométrio para a implantação e manutenção da prenhez, dentre outras funções (FERREIRA, 2010).

Durante toda a vida da fêmea, anterior a puberdade, durante a gestação e pós-parto, ocorre o crescimento folicular em forma de ondas (revisado por PEGORER, 2009). Cada onda folicular é caracterizada pelo crescimento de 20 folículos com diâmetro a partir de dois mm (ERENO, 2008). A dinâmica folicular é caracterizada por duas ou três ondas foliculares. E em rebanhos *Bos indicus* já foram reportadas até quatro ondas de crescimento (BÓ et al., 2003).

A primeira onda emerge no dia da ovulação, a segunda emerge nos dias nove ou dez e em ciclos de três ondas a emergência de novos folículos ocorre nos dias 15 ou 16 (MAPLETOFT et al., 2009).

Quando o maior folículo atinge o diâmetro de 6,2 a 8,4 mm para *Bos indicus*, em média dois e meio a três dias após a emergência folicular (GIMENES et al., 2008), ocorre o evento denominado desvio folicular. O desvio folicular é caracterizado pelo crescimento de um único folículo, o qual adquire receptores de LH e continua crescendo até atingir a capacidade ovulatória. Enquanto o restante, ainda dependentes de FSH, tornam se atresicos (GUINTER et al., 2001).

Essa queda nas concentrações de FSH se dá pela ação de um feed back negativo causado na hipófise pelos níveis elevados de E2 e inibina, os quais são secretados pelos folículos em crescimento (GUINTER et al., 1996). Por outro lado, o E2 secretado pelos folículos acentua a amplitude de pulsos de LH devido a um mecanismo de retroalimentação positiva na hipófise aumentando os receptores do hormônio liberador de LH (STUMPF et al., 1989).

Na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona, o folículo dominante (FD) não consegue induzir o pico de LH. Desta forma o FD acaba sofrendo atresia e não ovula (PEGORER, 2009). Quando os níveis séricos de P4 atingem um valor abaixo de 1 ng/mL, após a luteólise, volta a ocorrer aumento na frequência dos pulsos de LH (WILTIBANK et al., 2002).

A ovulação e o início da regressão do CL ocorrem concomitantemente devido ao aumento no fluxo sanguíneo dos folículos pré-ovulatórios e dentro do CL. Conseqüentemente aumentando a ofertas de hormônios gonadotróficos e fatores bioquímicos necessários para o desenvolvimento folicular e aumentando as secreções de prostaglandina e peptídeos vasoativos culminando para o início da regressão do CL (ACOSTA et al., 2004).

1.2 *Bos indicus* x *Bos taurus*

A ampla distribuição do rebanho *bos indicus* nos países tropicais e subtropicais se deu pela sua maior adaptabilidade aos altos índices pluviométricos e à temperatura elevada. Essas características favoreceram uma maior adaptabilidade quando comparado ao rebanho *bos taurus* (BARUSELLI et al., 2004).

De modo geral, as características do ciclo estral de fêmeas *bos indicus* quando comparadas as fêmeas *bos taurus* são consideradas semelhantes.

Porém, já foram reportadas algumas diferenças importantes na dinâmica do crescimento da onda folicular em *Bos indicus*, como menor diâmetro de folículo dominante e menor corpo lúteo quando comparada a *Bos taurus*. Quando vacas Nelore foram submetidas a um protocolo de sincronização de cio o folículo dominante apresentou $10,60 \pm 7,10$ mm dois dias após a retirada do implante (THOMAZI et al. 2009), enquanto em novilhas taurinas o folículo dominante mediu 12,8 mm (MARTINEZ et al. 2000).

FIGUEIREDO et al. (1997) relataram diâmetro de CL de $17,7 \pm 0,4$ mm em fêmeas Nelores. Resultado esse ligeiramente menor do que descrito por ADAMS et al. (1993) em fêmeas taurinas, encontrando diâmetro de 20 a 25 mm.

Também são reportados níveis séricos menores de estradiol e progesterona em gado indicus quando comparado ao taurino (WILTBANK et al., 1965).

Além disso, outras diferenças também foram descritas: menor duração do estro (10 horas) e tendência a demonstrar estro durante a noite (BÓ et al., 2003).

1.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Durante os últimos anos, com o intuito de aumentar a produtividade sem perda da lucratividade, novas técnicas operacionais vêm sendo estudadas para aumentar a eficiência das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial (IA) (BARUSELLI et al., 2010).

Partindo das dificuldades operacionais, como detecção de cio duas vezes ao dia, baixa taxa de serviço, escassez de mão de obra especializada (BARUSELLI et al., 2010), a IA vem perdendo a eficiência e até comprometendo a produção.

Diversos protocolos hormonais vêm sendo desenvolvidos para aumentar a taxa de prenhez de fêmeas bovinas (SOUZA et al., 2009), tendo como objetivo o aumento de produtividade em sistemas de produção de bovinos (BARUSELLI et al., 2004).

A IATF pode ser feita a partir de numerosas combinações hormonais que permitem a manipulação do ciclo estral, a ovulação de fêmeas bovinas (LUCY et al., 2004) e ainda a inseminação artificial sem a detecção de estro (MENEGETTI et al., 2009). Porém o seu uso rotineiro é dependente da viabilidade econômica e das condições do campo (LUCY et al., 2004).

A eficiência do tratamento com dispositivos intravaginais a base de progesterona ou medroxiprogesterona irá depender da administração (no momento da colocação do implante) GnRH ou estradiol, para que assim ocorra atresia ou ovulação do folículo dominante presente no ovário, sincronizando uma nova onda folicular (BÓ et al., 2003).

A aplicação da prostaglandina e a retirada do implante propiciam um ambiente hormonal favorável para a maturação final do folículo dominante (MADUREIRA et al., 2004). Com o objetivo de diminuir a variação no momento da ovulação do folículo dominante sincronizado, é indicado o uso de GNRH, LH ou estrógenos (BARUSELLI et al., 2010) no momento da retirada do implante ou alguns dias depois, dependendo na meia vida de cada fármaco. Em geral, a inseminação artificial deve ocorrer 54 a 56 horas após a retirada do implante (MADUREIRA et al., 2004).

1.4 Gonadotrofina Coriônica Equina

A Gonadotrofina Coriônica equina (eCG) é uma molécula de glicoproteína hormonal (ROY et al., 1999) produzida nos cálices endometriais da égua prenha entre 40 a 130 dias de gestação (BARUSELLI et al., 2006b). Sua meia vida no plasma sanguíneo é prolongada. Em ovinos já foi relatado até 60 horas (ROY et al., 1999), em bovinos até 72 horas (BARUSELLI et al., 2006b) e em equinos seis dias (DRION et al., 2001).

A eCG cria condições de crescimento folicular e de ovulação por se ligar aos receptores foliculares de FSH e de LH e aos receptores de LH do corpo lúteo (BARUSELLI et al., 2006a). ROCHA et al (2007) através dos seus resultados provou em seu experimento a influência que o eCG possui em acelerar a onda de crescimento folicular em animais acíclicos, tornando-os mais responsivos a onda ovulatória de LH.

Segundo BARUSELLI et al. (2004), no final da gestação, esteróides placentários são liberados causando um feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise na liberação de LH. A liberação do FSH vai causar a emergência de uma nova onda folicular dois a sete dias pós-parto, com crescimento do folículo dominante 10 a 21 dias pós-parto. Porém esse folículo pode não ovular devido à ausência do LH.

Após 15 a 30 dias pós-parto quando os níveis de LH se reestabelecem, os fatores limitantes para o retorno a ciclicidade da fêmea parida passam a ser o estado nutricional e o aleitamento. Não só a amamentação causa um efeito negativo na liberação de LH, mais também a visão, o olfato, a audição e o tato entre a mãe e o bezerro são responsáveis pelo anestro pós-parto prolongado. O anestro prolongado pós-parto é uma das principais perdas na produção bovina por causar um maior intervalo entre parto e concepção (BARUSELLI et al., 2004).

Além dos esteróides, a baixa condição corporal pós-parto também é responsável por causar esse efeito. Pois a nutrição possui efeitos diretos e indiretos na reprodução dos bovinos. O aumento do consumo de matéria seca junto com a maior deposição de gordura diminuem o feedback negativo na liberação do GnRH e conseqüentemente do LH. O principal fator nutricional que afeta o desempenho reprodutivo é a ingestão de energia. Visto que essa

ingestão excessiva ou deficiente pode interferir de forma negativa nos índices reprodutivos (SANTOS et al., 2006).

O uso do eCG é uma estratégia utilizada em vacas pós-parto com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva desses animais quando apresentam alta incidência de anestro. Ainda é recomendado para fêmeas com baixo estado de escore de condição corporal (ECC) (BÓ et al., 2004). Para animais cíclicos e com bom ECC, seu uso não é necessário (BARUSELLI et al., 2004; RENZIS et al., 2014).

Apesar do uso do eCG aumentar o custo do tratamento hormonal, ele é benéfico por retirar o desmame temporário do protocolo. Os bezerros que são separados da mãe, mesmo que por 48 horas, apresentam perda de peso, maior estresse e quando retomados a mãe aumentam o nível de diarreia (SILVEIRA et al., 2010). Pesquisas indicam a importância da utilização de eCG no momento da retirada do implante intravaginal, aumentando significativamente a taxa de ovulação e conseqüentemente de prenhez em vacas paridas recentemente submetidas a IATF (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004).

TORTORELLA et al. (2013) testaram a aplicação de 400 UI de eCG em vacas de corte em lactação submetidas a um mesmo protocolo de IATF, diferindo apenas no dia da aplicação do eCG. As fêmeas foram divididas em três grupos: controle, eCG dois dias antes da inseminação artificial (IA) e eCG no dia da remoção do implante. O grupo ao qual foi aplicado eCG dois dias antes da IA apresentou maior tamanho de folículo dominante, maior volume de CL, maior concentração sérica de P4 e maior taxa de prenhez quando comparado aos outros grupos. Em contraste, PULLEY et al. (2013) testaram o efeito do eCG em vacas holandesas em lactação não encontrando esses efeitos positivos do eCG já citados, ou seja, não teve efeitos na fertilidade dos bovinos. Eles ainda explicam que podem ter chegado nesse resultado pelas fêmeas estarem bem nutridas e ciclando. Corroborando com esse resultado, ERENO et al. (2007) não encontraram melhoria na taxa de prenhez de vacas Nelores recém paridas, ciclando e com bom escore de condição corporal submetidas a IATF com uso de eCG.

BARUSELLI et al. (2003) encontrou valores significativos na taxa de concepção de vacas Nelore pós-parto submetidas a IATF com uso de eCG e

sem o uso de eCG, 55,1 % e 38,9% respectivamente, indicando um efeito positivo do eCG.

Em uma revisão, RENZIS et al., 2014 concluíram que além do eCG aumentar a taxa de ovulação e o desenvolvimento do folículo dominante, ele ainda age em folículos pequenos e médios dependendo da dose administrada e da fase do ciclo estral que o animal se encontra, exceto nos atrésicos. Ainda confirmaram que por o eCG induzir a ovulação do folículo maior e mais funcional, irá conseqüentemente desenvolver um CL de melhor qualidade, aumentando a produção de progesterona, tendo um efeito positivo sobre o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. Esse efeito pode ou não ser notado em fêmeas cíclicas, porem são mais evidentes em animais não cíclicos.

O eCG também é utilizado em doadoras de embriões gestantes. Com o avanço da gestação, a produção dos oócitos vai diminuindo, para não perder a eficiência desse programa são realizadas aplicações com gonadotrofinas antes da aspiração folicular. O eCG além de aumentar o número de oócitos para aspiração age também aumentando a capacidade de desenvolvimento (ALLER et al., 2012).

1.5 Resposta Imunológica

O sistema imune produz uma gama de variedade de células e moléculas especializadas, que agindo em conjunto, reconhecem e eliminam diversos invasores estranhos específicos. Nos vertebrados, esse sistema é constituído pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa (imunidade adquirida) (KINDT et al., 2008).

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do organismo, sendo um importante ativador do sistema imune adaptativo. Ele é formado pelas barreiras físicas (pele, cílios e fimbrias), químicas (acidez dos componentes do estomago e moléculas solúveis que possuem atividade antimicrobiana) e celular (células que por meio de receptores detectam a presença dos microrganismos e estimulam o contra-ataque). A junção desses constituintes colaboram para um ataque imediato aos agentes infecciosos (KINDT et al., 2008). Em sua revisão, MANTOVANI (2010) cita que a eficácia da resposta inata não sofre influência de alguma exposição prévia a um antígeno.

Quando os patógenos escapam da defesa inata é ativada a imunidade adaptativa, o que requer tempo (cerca de uma semana ou mais). Essa defesa é constituída por uma grande população de linfócitos T e B, os quais combatem a infecção com uma resposta específica sob medida para o patógeno agressor. Diferente da imunidade inata, a adquirida possui memória imunológica, ou seja, uma vez desencadeada por um patógeno, futuras exposições iram gerar resposta rápida e mais vigorosa (KINDT et al., 2008).

Os responsáveis pela resposta adaptativa são os linfócitos T e B. Os linfócitos T agem destruindo as células infectadas por vírus e ativando outras células do sistema imune, incluindo os linfócitos B. Estes agem produzindo anticorpos, os quais causam a destruição ou neutralização dos antígenos (revisado por MANTOVANI, 2010).

1.6 Resposta Imunológica Contra eCG

Por ter um alto peso molecular (45 KDa) e uma origem heteróloga, o eCG pode se tornar potencialmente imunogênico (ROY et al., 1999). Essa característica ainda é reforçada pela alta porcentagem de carboidratos presentes na sua molécula, sendo o principal o ácido sialico (DRION et al., 2001).

DRION et al. (2001) testaram semanalmente o uso de altas doses de eCG em fêmeas bovinas e observaram que a partir da terceira aplicação, essa molécula pode provocar uma resposta imunológica com produção de anticorpos. Porém essa resposta foi bastante variável, com fêmeas produzindo altos níveis e outras níveis basais de anticorpos.

ROY et al (1999) já haviam encontrado essa variedade na resposta imunológica contra eCG em caprinos observando que fêmeas mesmo tratadas uma única vez exibiam uma resposta humoral semelhante aquelas previamente tratadas. Diferindo no tempo em que ocorria o aumento de anticorpos, sendo que para as fêmeas tratadas uma vez as concentrações aumentaram em dez dias após a injeção e para as previamente tratadas aumentaram com sete dias, e na concentração sérica máxima de anticorpos anti-eCG, variando entre 0,7 a 102 mg/ml e 3,0 a 219 mg/ml respectivamente. Como a resposta imune humoral demora para iniciar após a injeção, os anticorpos formados não interferem na bioatividade da eCG, ou seja, conseqüentemente não

atrapalhando na função do hormônio. Além disso, a mensuração da concentração de anticorpos 10 a 25 dias após o tratamento com eCG não mostrou correlação com a atividade.

No mesmo experimento, ROY et al. (1999) ainda investigaram cabras tratadas por quatro anos consecutivos com eCG. Os resultados mostraram que a baixa ou alta concentração de anticorpo anti-eCG é uma característica inerente de cada indivíduo e que essa variabilidade pode ser explicada pelas diferenças no complexo de histocompatibilidade principal (MHC), o qual está envolvido na regulação da resposta imunológica

Já foi descrito uma interferência negativa causada pelo anticorpo anti-eCG na taxa de prenhez em fêmeas caprinas submetidas a IATF. Essa queda na taxa de prenhez foi justificada pelo atraso do pico de LH, por consequência, a ovulação tornou-se tarde em relação a IA. Esse efeito foi descrito com maior frequência em fêmeas com altos níveis residuais de anticorpos anti-eCG (MAUREL et al., 2003), os quais são definidos como anticorpos já presentes no momento da aplicação do eCG (ROY et al., 1999).

Em um estudo com novilhas, MANTOVANI (2010) testou o tratamento de 400 UI de eCG, onde não foi observado efeitos sobre a dinâmica folicular, não interferindo dessa forma na eficiência da molécula quando usada em protocolos de IATF. Porém quando testou o hormônio em protocolos de superovulação (dose de 2000 UI) a produção de anticorpos comprometeu a eficiência do protocolo. Essa variabilidade na resposta foi explicada pelo fato da produção de anticorpos ser dose-dependente.

Corroborando com MANTOVANI (2010), THEAU-CLEMENT et al. (2008) encontraram em coelhas uma resposta imune após a sexta injeção de eCG, sendo essa resposta altamente ligada a dose injetada do hormônio. Porém não foi evidenciada nenhuma relação entre a resposta imune e a queda da fertilidade de coelhas na reutilização de até dez vezes do eCG (8 ou 25 UI).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127-140, 2004.
- ADAMS, G. P., et al. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Can J Anim Sci**; v.73, p.267-275, 1993.
- BARUSELLI, P. S.; et al. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós-parto. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 5., Proceedings, v.1, p.380, 2003.
- BARUSELLI, P.S.; et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2004.
- BARUSELLI, P. S.; et al. The Use of Hormonal Treatments to Improve Reproductive Performance of Anestrous Beef Cattle in Tropical Climates. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.479-486, 2004
- BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva de bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Anais...Londrina: [s.n.], 2006, p.113-132a
- BARUSELLI, P. S.; et al. Superovulation and Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006b
- BARUSELLI, P. S.; et al. Atualização dos Protocolos de IATF e TEFT. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 4, 2010, Londrina, PR. Anais...Londrina: [s.n.], 2010, p.166-185
- BARUSELLI, P. S.; et al. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 433-448, 2008.
- BÓ, G. A.; et al. Patter and Manipulation of Follicular Development in *Bos indicus* Cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003
- BÓ, G. A.; et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl): p.1-22, 2004
- CARRIJO JUNIOR, O. A.; LANGER, J. Avaliação de Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo utilizando eCG em Vacas Nelore Puras e Paridas.

Revista Electrónica de Veterinaria. REDVET ISSN 1695-7504
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> .Vol. VII, Nº 02, Febrero/2006.

DRION, P. V.; et al. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 41, p. 207–215, 2001.

ERENO, R. L.; et al. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. **R. Bras. Zootec.** v. 36, n. 5, p. 1288-1294, 2007.

ERENO, R. L. Expressão gênica das isoformas do receptor do Hormônio luteinizante(lhr) em células da Granulosa antes, durante e após o desvio Folicular em novilhas Nelore. 2008. 81f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/ Doutor em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2008.

FERREIRA, A. M. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). In: FERREIRA, A. M. Ciclo estral e ondas foliculares em bovinos. Juiz de Fora, MG: Edição do Autor, 2010. Cap.1, p.25-61.

FIGUEIREDO, R.A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997

GIMENES, L. U.; et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, n. 69, p. 852–858, 2008.

GINTHER O.J.; et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 55, p.1187–94, 1996

GINTHER, O. J.; et al. Follicle Selection in Monovular Species. **Biology of reproduction**, n. 65, p. 638–647, 2001.

HAFEZ, B.; HAFEZ E. S. E. Reprodução Animal. In:_____ **Ciclos reprodutivos**. Barueri, SP: Manole, 2004. Cap.4, p.55-67.

KINDT, T. J. et al. Imunologia de Kuby. In:_____ **Visão geral do sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 2008. Cap.6, p.76-97.

LUCY, M. C.; et al. The Use of hormonal Treatments to Improve the Reproductive Performance of Lactating Dairy Cows in Feedlot or Pasture-

Based Management Systems. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.495–512, 2004

MADUREIRA, E. H.; et al. Sincronização com Progestágenos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. Anais... Londrina: [s.n.], 2004. p.117-128

MANTOVANI, A. P. **Resposta Imunológica contra gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2010. 92f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/ Doutora em Ciência)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTINEZ, M. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 757-769, 2000.

MAPLETOFT, R. J.; et al. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Anim. Reprod.**, v.6, n.1, p.114-124, Jan./Mar. 2009.

MAUREL, M. C; et al. Réponse immunitaire à la eCG utilisée dans le traitement de l'induction d'ovulation chez la chèvre et la brebis. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**. v. 31, p. 766–769, 2003.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009

PEGORER, M. F. **Taxas de ovulação e prenhez em novilhas Nelore cíclicas após utilização de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (iatf), com diferentes concentrações de progesterona, associadas ou não a aplicação de eCG**. 2009. 89f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/ Doutor em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2009

PINTO-NETO, A; et al. Reutilização de implante intravaginal de progesterona para sincronização de estro em bovinos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 12, n. 2, p. 169-174, jul./dez. 2009.

PULLEY, S. L.; et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**. V. 79, p. 127–134, 2013.

- RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. **Reprod Dom Anim.** v. 49, p. 177–182, 2014. doi: 10.1111/rda.12268. ISSN 0936–6768
- ROCHA, J. M. et al. IATF em vacas Nelore: Avaliação de duas doses de eCG e reutilização de implantes intravaginais de progesterona. **Medicina Veterinária**, Recife, v.1, n.1, p.40-47, jan-jun, 2007
- ROY, F. et al. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of reproduction**, v.60, p.805-813, 1999
- SANTOS, J. E. P.; SÁ FILHO, M. F. Nutrição e Reprodução em Bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Anais...Londrina: [s.n.], 2006. p.30-54
- SILVEIRA, A. P. et al. Efeito do Período Pós-Parto sobre a Taxa de Prenhez de Vacas de Corte Submetidas a IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo). **Colloquium Agrariae**, v. 6, n.2, p. 40-45, Jul-Dez. 2010
- SOUZA, A. H. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, p.10-21, 2009
- STUMPF, T.T., et al. Effect of oestradiol on luteinizing hormone secretion during the follicular phase of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.41, p.91-99, 1989.
- THEAU-CLEMENT M. et al. Evolution of anti-eCG antibodies in response to eCG doses and number of injections. Relationship with productivity of rabbit does. **The Animal Consortium**, 2:5, p. 746–751, 2008. doi: 10.1017/S1751731108001833
- THOMAZI, 1. S; et al. Dinâmica ovariana e concentração de progesterona de vacas Nelore submetidas a iatf. **arq. ciênc. vet.** Zool. unipar, Umuarama, v. 12, n. 2, p. 135-140, jul./dez. 2009.
- TORTORELLA, R. D.; et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204–1209, 2013.

VARAGO, F. C.; et al. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun.2008

WILTBANK, M. C. et al. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, n.57, p. 21-52, 2002. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00656-2.

CAPÍTULO 2

Evaluation of follicle dynamics and ovulation rate in *bos indicus* cows after consecutive application of 8 doses of eCG

Avaliação da dinâmica folicular e taxa de ovulação de vacas *Bos indicus* após aplicação consecutiva de 8 doses de eCG

Bhárbara Delboni Stuhr^I, Isaac Santos Gil^I, Tracy Ferreira Lacerda^I, Barbara Loureiro^{I,II}

I - Laboratory of Reproductive Physiology, University of Vila Velha, Vila Velha, Brazil

II - Corresponding author: Bárbara Loureiro, Rodovia do Sol, 644, Vila Velha, ES, Brazil. Phone: 55 27981116677. Email: Barbara.loureiro@uvv.br

ABSTRACT

The equine chorionic gonadotropin (eCG) is a glycoprotein produced in the endometrial calices of the mare. In bovine, it is used in association with hormonal estrus synchronization protocols. However, studies have shown that it is potentially immunogenic and its effect can decrease after repetitive use. Thus, this study aimed to evaluate antral follicle growth, pre-ovulatory follicle and CL diameter and ovulation rate in *bos indicus* cows submitted to an estrus synchronization protocol in association with eCG for eight times consecutively. Ten cyclical, multiparous, single and pasture raised beef cows were divided into two groups: control group (n = 5) and eCG group (n = 5). In 30 day interval, the animals were synchronized with the same protocol, totalizing 8 re-synchronizations. The treatment received by the animals was as follows: Day 0 an intravaginal progesterone implant and 2 mg of estradiol benzoate (EB). On day 7, animals received 500 mg of sodium cloprostenol. On day 9, the implant was removed and 0.6 mg of estradiol cypionate was applied, the cows in the treatment group also received 300 IU of eCG. A series of ultrasound examinations were performed to evaluate the ovaries. On Day 4 of the protocol (approximately 1.5 days after follicle recruitment) to count antral follicles, on Day 10, to count antral follicles and to measure the size of the largest follicle and on Day 18 to measure the diameter of the CL. No significant difference between follicular growth and size of the pre-ovulatory follicle was found between groups. However, cows that were treated with eCG had a larger ($P < 0.05$) CL and increased ($P < 0.05$) ovulation rate (18 mm and 92%, respectively) when compared with the control group (14.1 mm and 80%, respectively). Furthermore, consecutive treatments with eCG did not affect CL nor ovulation rates. In conclusion, eCG treatment increased CL size and ovulation rate even after 8 consecutive treatments.

Key words: corpus luteum, eCG, fertility, immunity, FTAI.

RESUMO

A gonadotropina coriônica equina (eCG) é uma glicoproteína produzida nos cálices endometriais da égua. Em bovinos, é utilizada em associação com os protocolos hormonais de sincronização do estro. No entanto, estudos têm mostrado que ela é potencialmente imunogênica e que o seu efeito pode diminuir depois de utilização repetida. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento dos folículos antrais, diâmetro do folículo pré-ovulatório e CL e taxa de ovulação em vacas *bos indicus* submetidas a um protocolo de sincronização em associação com eCG por oito vezes consecutivas. Dez vacas de corte, cíclicas, múltiparas, solteiras e criadas a pasto foram divididas em dois grupos: grupo controle (n = 5) e grupo eCG (n = 5). Em um intervalo de 30 dias, os animais foram sincronizados com o mesmo protocolo, totalizando oito re-sincronizações. Resumidamente: dia 0 inserção do implante intravaginal de P4 e aplicação 2 mg BE. Dia 7, 500 mg PGF2 alpha. Dia 9, o implante foi removido e 0,6 mg de ECP foi aplicado, as vacas do grupo de tratamento receberam também 300 UI de eCG. Uma série de exames ultrasonográficos foram realizados para avaliar os ovários. No dia 4 do protocolo (aproximadamente 1,5 dias após o recrutamento folicular) para contar folículos antrais, no dia 10, contar folículos antrais e medir o tamanho do maior folículo e dia 18 para medir o diâmetro do CL. Não foi encontrada diferença entre o crescimento folicular e o tamanho do folículo pré-ovulatório entre os grupos. No entanto, as vacas tratadas com eCG tinham um maior CL e aumentaram a taxa de ovulação (P < 0,05; 18 mm e 92%, respectivamente) quando comparadas com o grupo controle (14,1 mm e 80%, respectivamente), não havendo influência dos repetidos tratamentos. Em conclusão, o tratamento com eCG aumentou o tamanho do CL e taxa de ovulação, mesmo depois de 8 tratamentos consecutivos.

Palavras-chave: corpo lúteo, fertilidade, imunidade, IATF

INTRODUCTION

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is a glycoprotein hormone molecule (ROY et al., 1999) produced in the endometrial calices of pregnant mares between 40 to 130 days of gestation (BARUSELLI et al., 2006a). When applied exogenously, the eCG creates conditions for follicular growth and ovulation by binding to FSH and LH follicle receptors and LH receptors of the corpus luteum (BARUSELLI et al., 2006b).

Association of eCG with hormonal estrus synchronization protocols increase ovulation and pregnancy rates. Furthermore, eCG induces ovulation of the largest and most functional follicle, which therefore will develop a better quality corpus luteum (CL), increasing progesterone production, having a positive effect on embryonic development and survival (RENSIS & LÓPEZ-GATIUS, 2014).

The eCG is indicated for newly calved females, animals with low body condition score, and also for females who are not cycling (BO et al., 2004; BARUSELLI et al., 2004). It should also be used in lactating females, as it eliminates the need for temporary calf removal, which even when held for only 48 hours, causes stress on the mother and calf (SILVEIRA et al., 2010).

However, due to a heterologous origin, a high molecular weight, high degree of glycosylation and longer half-life, eCG becomes a potentially immunogenic molecule when applied in cattle (DRION et al., 2001). Thus, animals that undergo successive treatments with eCG appear to become refractory to this molecule (BARUSELLI et al., 2008), not effectively responding to the treatment (DRION et al., 2001).

The production of anti-eCG antibodies has been reported in goats, sheep, cows, and rabbits (ROY et al., 1999a; ROY et al., 1999b; DRION et al., 2001; THEAU-CLEMENT et al., 2008, respectively). These antibodies are responsible for reducing the interaction of eCG with FSH and LH receptors (MAUREL et al., 2003). As a consequence a delay could occur in the LH surge and ovulation, reducing the females' fertility. Some studies report antibody production from the first eCG application (ROY et al., 1999a; MANTOVANI, 2010) while others claim that there is an additive effect in repeated applications (DRION et al., 2001; MANTOVANI, 2010).

Thus, this study aimed to evaluate follicular growth, diameter of the pre-ovulatory follicle and CL, as well as ovulation rate in *bos indicus* cows submitted to an estrous synchronization protocol associated with eCG for eight consecutive times.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed from January to September 2015 at Fazenda Nossa Senhora da Penha located in Linhares, ES (19°11'4"S and 39°49'35"W). Ten crossbred *bos indicus* cows, aged between 4 and 6 years old, with body condition score ranging from 3 and 3.5 (scale of 1-5; LOWMAN et al., 1976), multiparous and single, were used. The animals were pasture raised (*Brachiaria humidicola*), receiving mineral salt and water *ad libitum*. All animals had already received three doses of eCG (200 IU) referring to hormonal synchronizations in the previous three years.

The animals were divided into two groups: control (n = 5) and eCG (n = 5). The entire hormonal treatment was done in all the animals in each replica, being repeated 8 times with a 30 day interval.

In order to reinitiate follicular wave, all females received, on a random day of the estrous cycle, 2 mg of estradiol benzoate intramuscularly (Sincrodiol, Ouro Fino, Brazil) and an intravaginal progesterone implant (PRIMER; 1g of progesterone; Tecnopec, Brazil), being considered as Day 0 (Day 0).

On Day 4 of the hormonal treatment (approximately 1.5 days of follicular recruitment) animals were evaluated by ultrasound (US; MINDRAY, DP-2200VET model with 7.5 MHz linear transducer) for antral follicle count and presence and location of preexisting corpus luteum (CL) prior to hormonal treatment.

On Day 7 500 mg of sodium cloprostenol (Ciosin; MSD Saúde Animal, Brazil) was administered intramuscularly. After 48 hours, on Day 9, the intravaginal implant was removed and 1 mg of estradiol cypionate applied intramuscularly (ECP; Zoetis, Brazil). Females belonging to the eCG group also received in this time period 300 IU of ECG intramuscularly (Novormon; Zoetis). All handling was performed at the same time (0800).

On Day 10 the amount of antral follicles and diameter size of the largest follicle in the right and left ovary was evaluated using an US. On Day 18 (seven

days after presumable ovulation) an ultrasound evaluation for presence and diameter of the corpus luteum in response to the hormonal treatment was performed.

Figure 1 shows hormonal treatment of control and eCG group.

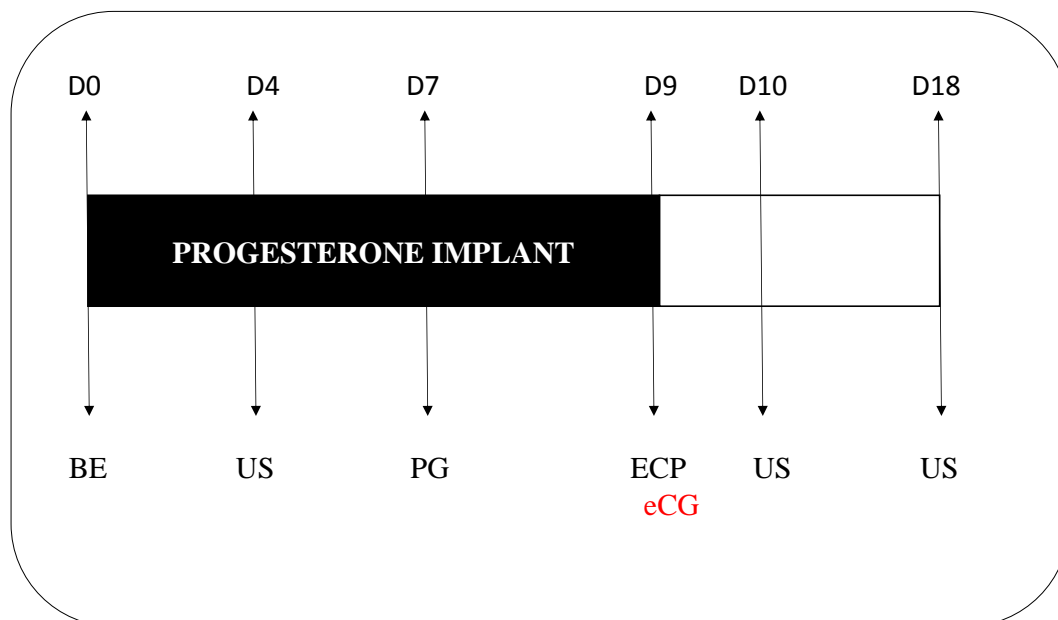


Figure 1. Estrus synchronization protocol and ultrasound evaluation in *Bos indicus* cows. Cows in the control group did not receive eCG on Day 9.

Statistical analysis

All data were analyzed using the SAS statistical software (SAS 9.2, North Carolina, USA). The number of follicles on Day 4 and Day 10, follicle size at Day 10 and CL size on Day 18 in the right and left ovaries was assessed by analysis of variance using the SAS PROC MIXED. Being the animal considered the subject and the replica the repeated measure. Treatment effects and the interaction between replica and treatment were considered. Individual analyzes were performed using the PDIFF function (probability of individual differences). The percentage of animals ovulating per replica was assessed by analysis of variance using the PROC GLM; data were transformed to arcsine before analysis.

RESULTS

Results are presented as least square means (LSmeans) and standard deviation. No difference was observed in the number of antral follicles on Day 4

between control and eCG treated animals nor an interaction between replicate and treatments (Fig. 2).

Also, no difference was observed in the number of follicles (Fig. 3) or size of the largest follicle on Day 10 between control or eCG treated animals nor an interaction between replica and treatment (Fig. 4).

Cows treated with eCG had a larger ($P < 0.05$) CL on Day 18 when compared with cows from the control group (Fig. 5).

Furthermore, the administration of eight doses of eCG consecutively did not alter ovulation rate ($P < 0.05$; Fig. 7).

When the percentage of cows that ovulated per replica was analyzed there was an increase ($P < 0.05$) in ovulation rate for the cows receiving eCG (Fig. 6).

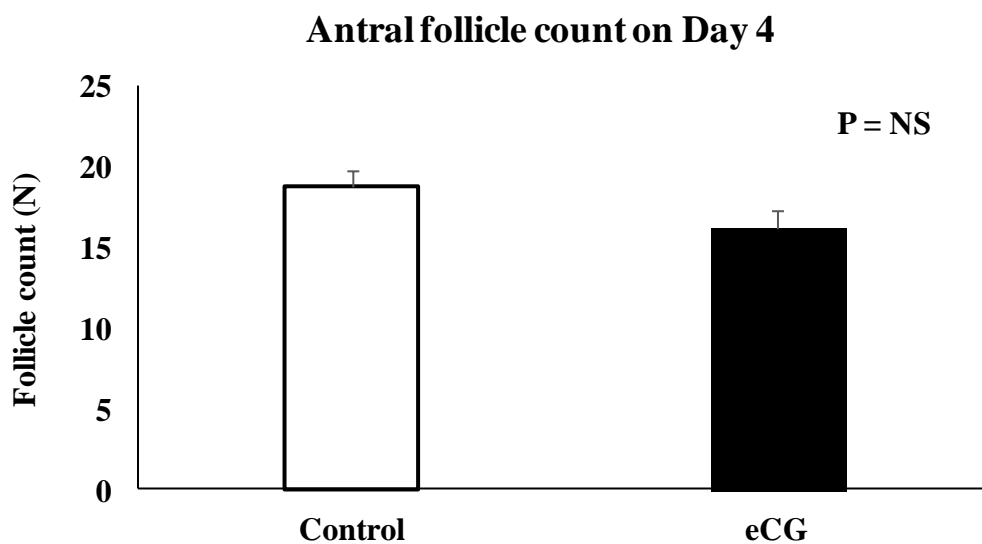


Figure 2. Antral follicle count on Day 4 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 1.5 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

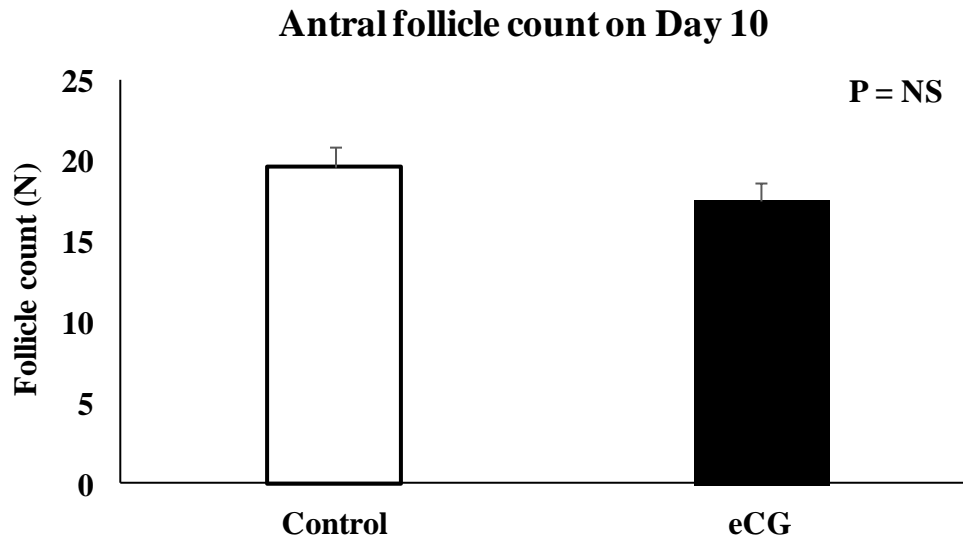


Figure 3. Antral follicle count on Day 10 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 7 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

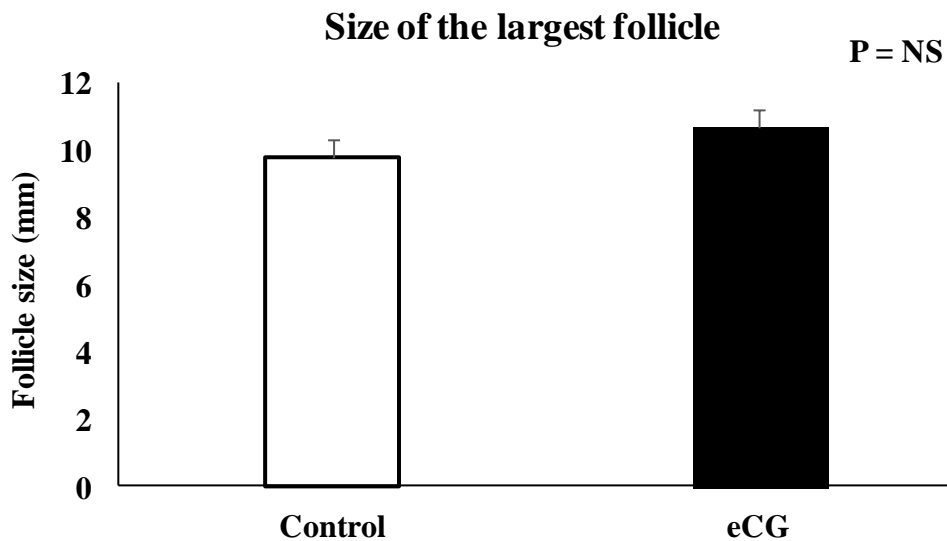


Figure 4. Size of the largest follicle (mm) measured on Day 10 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 7 days after follicle recruitment) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

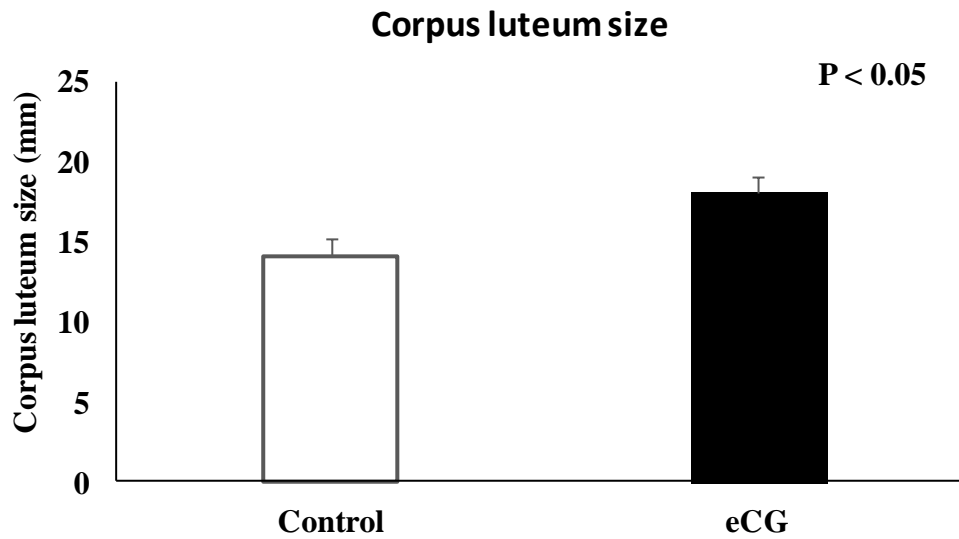


Figure 5. Corpus luteum diameter (mm) measured on Day 18 of an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol (approximately 7 days after the presumable ovulation) from control and eCG treated cows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

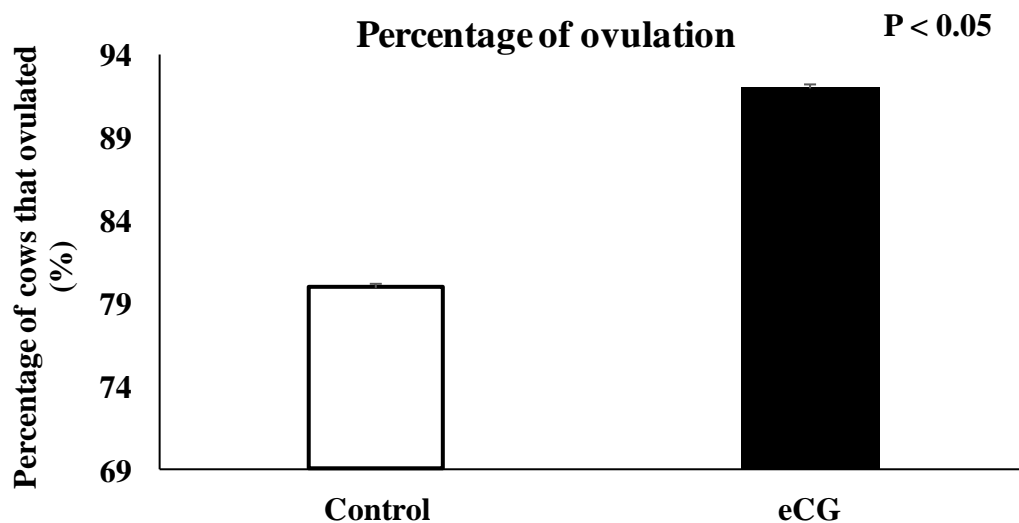


Figure 6. Percentage of cows ovulating in control and eCG treated groups after an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

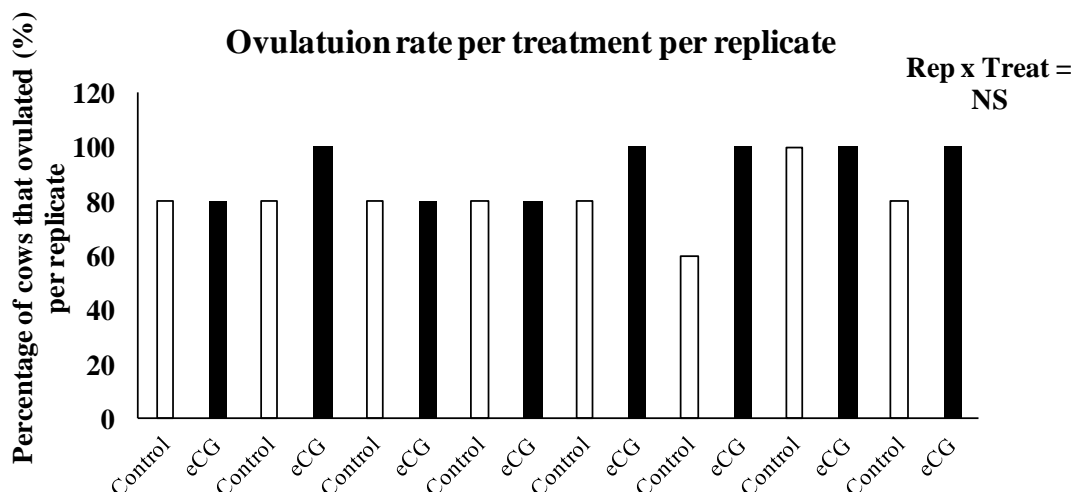


Figure 7. Percentage of cows ovulating per replicate in control and eCG treated groups after an estrogen-progesterone based estrus synchronization protocol. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

DISCUSSION

The use of eCG for eight times consecutively did not diminish ovulation as hypothesized previously or influence the follicle wave of the subsequent estrus cycle. Furthermore, animals in the eCG group had a larger CL, but no difference was found in the number of follicles or the pre-ovulatory follicle size after eCG administration.

The eCG is usually used in estrus synchronization protocols as a follicle developing agent due to its FSH- and LH-like activity (TORTORELLA et al., 2013). However, some authors have suggested that due to the protein's size and long plasma half-life an immune response against the eCG molecule can be developed by the animals which would decrease the eCG's effect after repetitive use (revised by DRION et al., 1998; ROY et al., 1999a; DRION et al., 2001).

The positive effect of eCG on follicle development has not been completely determined. Some authors have shown that it can increase pre-ovulatory follicle size and that would end up in a larger CL (TORTERELLA et al., 2013). The size of the CL is important for progesterone secretion and pregnancy maintenance (RIGOGLIO et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014). However, in other studies eCG did not influence pre-ovulatory follicle size but it rather enhanced CL size (BARUSELI et al., 2004; PULLEY et al., 2013;

MARQUEZINI et al., 2014). Even though we didn't observe an increase in pre-ovulatory follicle size we did observe a larger CL. An increase in progesterone concentration has also been described as a positive effect of the eCG (SANTOS et al., 2001; BARUSELLI et al., 2004; SOUZA et al., 2009; MARQUEZINI et al., 2014). The eCG acts increasing the number of luteal cells and mitochondrias that in turn increases pregnenolone synthesis (RIGOGGIO et al., 2013).

The immunogenic action of eCG have been shown in goats, sheep, cows and rabbits (ROY et al., 1999a; ROY et al., 1999b; DRION et al., 2001; THEAU-CLEMENT et al., 2008, respectively). However, these studies were performed using high doses of the hormone (500 IU in goats and sheep and 2000 IU in cows). Here we used 300 IU, dose that is routinely used in fixed time artificial insemination (FTAI) programs in *bos indicus* cows. The treatments were repeated eight times in a 30 day interval. Usually, a *bos indicus* cow will be hormonally stimulated one or two times per breeding season and will last for about eight to ten pregnancies. The treatment suggested in this study is closer to what happens at the field.

The eCG administration can increase the concentration of anti-eCG antibodies after the first use (ROY et al., 1999b; MANTOVANI, 2010) and some studies have reported an additive effect of subsequent treatments (ROY et al., 1999a; DRION et al., 2001). Furthermore, most studies have concluded that there is an animal individuality to the immune response against eCG (DRION et al., 2001; MANTOVANI, 2010). This immune response can be especially deleterious to fertility. The anti-eCG antibodies can delay the LH surge and in consequence ovulation will be belated desynchronizing with the moment of FTAI (ROY et al., 1999a; MAUREL et al., 2003). Furthermore, female goats with high anti-eCG concentration showed low fertility after FTAI due to a low follicle development and decreased steroidogenesis (ROY et al., 1999a). MANTOVANI (2010) observed a negative correlation between the concentration of anti-eCG antibodies and number of antral follicles (> 6 mm) after the second treatment with 2000 IU eCG. However, when a high dose of eCG (800 IU) was administered before follicle deviation it increase double ovulation rate (DUFFY et al., 2004; MARTINEZ et al., 2014)

Here we showed that even after the eighth treatment the cows in the eCG group continued to ovulate. Furthermore, cows in the eCG group had a larger CL which is associated with better pregnancy rates and lower pregnancy losses.

CONCLUSION

The repeated use of eCG in a low dose did not diminish antral follicle growth or ovulation rate. Contrariwise, the use of eCG in the FTAI protocol increased CL size.

REFERENCES

- BARUSELLI, P. S. et al. The Use of Hormonal Treatments to Improve Reproductive Performance of Anestrous Beef Cattle in Tropical Climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.025.
- BARUSELLI, P. S. et al. Superovulation and Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006a. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.006
- BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva de bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina, PR. **Anais...Londrina**: [s.n.], 2006, p.113-132b
- BARUSELLI, P. S. et al. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol 36, p 433-448, 2008.
- BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl), p.1-22, 2004
- DRION, P. V. et al. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 41, p. 207-215, 2001.
- DUFFY, P. et al. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**. V. 61, P. 725-734, 2004. doi:10.1016/S0093-691X(03)00255-3
- LOWMAN, B. G. Et al. Condition scoring of cattle. **Bulletin East Scotland College Agriculture**, 6: 8, 1976

MARTINEZ, M. F. et al. Development of a GnRH-PGF2 α -progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle. **J. Anim. Sci.** V. 92, P. 4935-4948, 2014. doi:10.2527/jas2013-7512.

MANTOVANI, A. P. **Resposta Imunológica contra gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus*.** 2010. 92f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/ Doutora em Ciência)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARQUEZINI, G. H. L. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin on follicle development and pregnancy rates in suckled beef cows with or without calf removal. **J. Anim. Sci.**, v. 91, p. 1216-1224, 2013. doi:10.2527/jas2012-5382

MAUREL, M. C. et al. Réponse immunitaire à la eCG utilisée dans le traitement de l'induction d'ovulation chez la chèvre et la brebis. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 31, p. 766-769, 2003. doi:10.1016/S1297-9589(03)00214-5

PULLEY, S. L. et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 79, p. 127-134, 2013. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.017

RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. **Reprod Dom Anim**, v. 49, p. 177–182, 2014. doi: 10.1111/rda.12268.

RIGOGLIO, N. N. et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v. 79, p. 673-679, 2013. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.023

ROY, F. et al. The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex. **Biology of reproduction**, v. 60, v. 4, p. 805–813, 1999. Doi: 10.1095/biolreprod60.4.805a.

ROY, F. et al. Humoral Immune Response to Equine Chorionic Gonadotropin in Ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and Interference with Subsequent Fertility. **Biology of reproduction**, v.61, p.209-218, 1999b.

- SANTOS, J. E. et al. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **J Anim Sci**. v. 79, p 2881-94, 2001. doi:/2001.79112881x.
- SILVEIRA, A. P. et al. Efeito do Período Pós-Parto sobre a Taxa de Prenhez de Vacas de Corte Submetidas a IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo). **Colloquium Agrariae**, v. 6, n.2, p. 40-45, 2010. doi: 10.5747/ca.2010.v06.n2.a057.
- SOUZA, A. H. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.12.025
- THEAU-CLEMENT M. et al. Evolution of anti-eCG antibodies in response to eCG doses and number of injections. Relationship with productivity of rabbit does. **The Animal Consortium**, 2:5, p. 746–751, 2008. doi: 10.1017/S1751731108001833
- TORTORELLA, R. D. et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204-1209, 2013. Doi: 101016/j.theriogenology.2013.02.019.