

## SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Ciro Moraes Barros<sup>1</sup>, Ana Cláudia Z. Barcelos<sup>1</sup> e Marcelo F. G. Nogueira<sup>2</sup>

### RESUMO

Nos últimos anos o Brasil tornou-se líder mundial na produção de embriões bovinos. Isto foi possível graças a ampla utilização e aperfeiçoamento de biotécnicas como a inseminação artificial (IA), a indução de ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões (MOET) e a produção in vitro de embriões (PIV). Esta mini-revisão é uma continuação da apresentada durante o I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (Londrina, 2004) e destaca aperfeiçoamentos no protocolo superestimulatório denominado P-36, no qual o momento da ovulação é controlado por uma fonte exógena de progesterona e aplicação de LH, permitindo o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras de embriões.

### INTRODUÇÃO

O gado zebuino (sub-specie *Bos taurus indicus*, Meirelles et. al., 1999) predomina nas regiões tropicais devido a melhor tolerância ao estresse térmico e resistência a parasitas, quando comparado às raças européias (*Bos taurus taurus*). No Brasil, a maioria dos animais de corte pertence à raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A indução de ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões (MOET) é uma biotécnica da reprodução útil para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuino. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de transferência de embriões (Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006).

A superestimulação de doadoras bovinas tem sido amplamente estudada na tentativa de desenvolver protocolos que melhorem a produção de embriões ou facilitem o manejo dos animais (revisado por Barros et al., 2001, Baruselli et al., 2006). A detecção do estro é particularmente difícil no gado zebuino devido a curta duração do comportamento estral e elevada incidência de estro noturno (Pinheiro et al., 1998). Para superar este problema vários tratamentos hormonais foram desenvolvidos para controlar o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação, a fim de permitir a inseminação artificial em tempo-fixo (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004). De forma similar, o desenvolvimento folicular e a ovulação podem ser manipulados farmacologicamente para melhorar programas de superestimulação e transferência de embriões bovinos (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006).

Nesta mini-revisão será dada ênfase a modificações no protocolo superestimulatório denominado P-36, no qual o momento da ovulação é controlado por uma fonte exógena de progesterona e aplicação de LH, permitindo o uso da inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em doadoras zebuínas e taurinas.

<sup>1</sup>Depto. de Farmacologia, Instituto de Biociências (UNESP – Botucatu, SP)

<sup>2</sup>Depto. de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras (UNESP-Assis) cmbarros@ibb.unesp.br; marcelo@assis.unesp.br

## SUPEROVULAÇÃO E PROTOCOLO P-36

Inúmeros tratamentos hormonais para induzir ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001; Baruselli et al., 2006). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987; Alfuraiji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

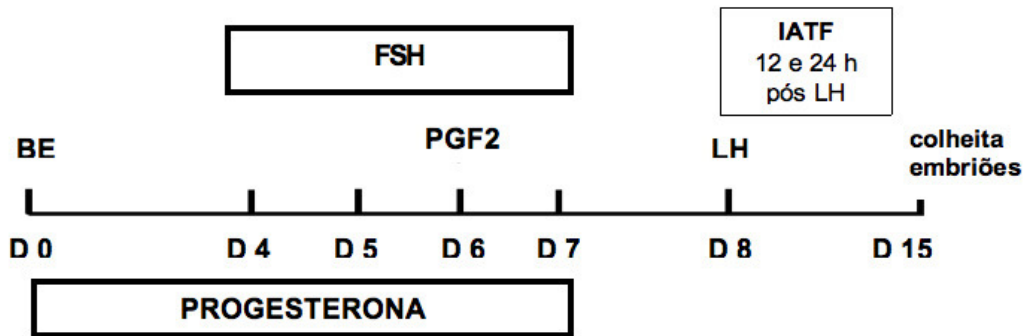
Existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório pode diminuir a produção de embriões. (Guibault et al., 1991; Lussier et al., 1995). A fim de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos, algumas estratégias foram desenvolvidas, como por exemplo, começar a superestimulação com FSH no primeiro dia do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996) e sincronizar o início das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

Por meio de uma série de experimentos Reuben Mapletto e Gabriel Bo demonstraram que o uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais), associada a administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e origina uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início dos tratamentos (revisto por Bó et al., 1995, 2003). A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF $2\alpha$  e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

Foi sugerido que folículos que não ovulam, após superestimulação com FSH, não se desenvolveram normalmente ou não possuem quantidade suficiente de receptores de LH para responderem ao pico pré-ovulatório de LH (Xu et al., 1995; D'Occhio et al., 1997; Liu et al., 1998). Portanto, estratégias que atrasam o pico pré-ovulatório de LH tem sido utilizadas na tentativa de aumentar o número de embriões (D'Occhio et al., 1997; Van de Leemput et al., 2001) ou ainda para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (Barros & Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006).

Barros & Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro. Entretanto, com estes tratamentos hormonais foi possível controlar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. A partir destes experimentos um novo protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001; 2005), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B<sup>®</sup> ou DIB<sup>®</sup>) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF $2\alpha$  (daí a denominação P-36) e a ovulação é

induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de progesterona (ou seja, 48 h após a aplicação de PGF2 $\alpha$ ). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de LH (27), a IATF é realizada 12 e 24 h após a injeção de LH, evitando a inconveniência da detecção do estro (veja figura a seguir).



**Figura 1. Protocolo superovulatório P-36.** Em dia aleatório do ciclo estral (denominado dia 0 = D0) é colocada uma fonte de progesterona (CIDR, DIB, Cronipress) e administrado 2,0 a 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) via intramuscular. Quatro dias mais tarde começa o tratamento superestimulatório com FSH. Na manhã do dia 6 (D6) administra-se dose luteolítica de PGF2 $\alpha$  (via IM) e no dia 7 à noite (D7) remove-se o dispositivo intravaginal, logo após a última dose de FSH. No dia seguinte às 8:00 h (D8) é aplicado 12,5 mg de LH (Lutropin<sup>®</sup>, via IM) e as doadoras são inseminadas em tempo fixo (IATF) 12 e 24 h após o LH.

Já foi demonstrado que a redução da dose de 25 para 12,5 mg de LH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis (9,8 $\pm$ 1,09, e 9,2 $\pm$ 0,77, respectivamente) ou a taxa de viabilidade (73,7 e 69,5%, respectivamente; Nogueira et al., 2002; Nogueira & Barros 2003). Resultados preliminares obtidos por Nogueira indicam que talvez seja possível reduzir a dose de LH para 6,25 mg (8,8 $\pm$ 0,82 e 66,8%, embriões viáveis e taxa de viabilidade, respectivamente; Nogueira & Barros 2006). Além disso, podem-se utilizar diversas fontes exógenas de progesterona (CIDR, DIB ou Cronipress) sem que ocorram alterações na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira & Barros, 2006).

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore (Nogueira & Barros, 2001; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006). Em publicação recente, Nogueira et al. (2006) reportaram em 150 colheitas a média de 13,2 estruturas totais e 9,3 embriões viáveis, com 71,0% (1401/1973) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36.

## MODIFICAÇÕES NO PROTOCOLO P-36

Uma variação do protocolo P-36, onde o dispositivo intravaginal é retirado 24 h após a PGF2 $\alpha$  (protocolo P-24) e o LH continua a ser administrado no dia 9 (48 h após a PGF2 $\alpha$ ), também pode ser utilizada em fêmeas Nelore, com resultados comparáveis ao obtidos com o P-36 (Zanenga et al., 2003, Baruselli et al. 2006).

Embora o esquema mais utilizado, para inseminar doadoras superestimuladas, seja uma inseminação 12 e outra 24 h após a indução da ovulação (Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006), é possível realizar-se apenas uma IATF para reduzir o custo do sêmen. A utilização de uma única palheta de sêmen, não reduziu significativamente a taxa de viabilidade quando a IATF foi realizada 16 h (52,4 e 58,3%, respectivamente; uma vs duas IATF, Baruselli et al., 2006) ou 24 h após a administração de LH, no protocolo P-36 (57,7 e 66,2% respectivamente; dados não publicados fornecidos por Marcelo F.G. Nogueira). Entretanto, deve-se tomar especial cuidado com a qualidade e quantidade de sêmen a ser utilizado em uma única IATF em vacas superovuladas, a fim de evitar queda na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Nogueira & Barros, 2006).

Em algumas raças européias, o fato da utilização do protocolo P-36 originar taxas de embriões viáveis inferiores aos protocolos convencionais, motivou o estudo de alterações no protocolo P-36 para as raças européias. Tanto na raça Holandesa (Baruselli et al., 2006) como na Angus (Bó, resultados apresentados oralmente durante reunião Anual da SBTE, 2006, Araxá, MG), o protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), ao invés de 48 horas (P36/LH48), era administrado 60 horas após a administração de PGF2 $\alpha$  (P36/LH60). De forma similar, Barcelos et al. (2006), mostraram que na raça Bonsmara (5/8 Africâner e 3/8 Hereford e Shorthorn) a aplicação de LH 60 h após a PGF2 $\alpha$ , resultou em taxas de embriões viáveis numericamente superiores ao protocolo P36/LH48 (Tabela 1). Além disso, Barcelos et al. (2006), testaram uma outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de FSH por uma aplicação única de eCG para estimular tanto o crescimento final quanto a maturação dos folículos ovarianos (atividade LH do eCG). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, os resultados são indicativos de que a associação de eCG ao protocolo P-36 pode ser benéfica e merece ser melhor investigada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Total de estruturas colhidas, embriões viáveis e taxa de viabilidade nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG

	P36/LH48 (n=12)	P36/LH60 (n=12)	P36/LH48/eCG (n=12)
Total de estruturas colhidas	7,17 $\pm$ 1,85	11,42 $\pm$ 3,45	9,75 $\pm$ 2,01
Total de embriões viáveis	4,58 $\pm$ 1,53	8,42 $\pm$ 2,44	6,58 $\pm$ 1,32
Taxa de viabilidade (%)	59,40	73,73	67,49

Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ )

É importante frisar que o atraso no momento da ovulação (P-36/LH60) é benéfico para raças européias, porém o mesmo não ocorre com a raça Nelore, onde esta modificação no protocolo P-36 promove diminuição no número de embriões viáveis (Baruselli et al., 2006). Portanto, na raça Nelore o melhor protocolo continua a ser o protocolo P-36 original (P36/LH48).

Em resumo, o protocolo P-36/LH48 facilita o manejo de doadoras de embriões e origina taxas de embriões viáveis pelo menos tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do cio. Nas raças

européias testadas até o momento (Holandesa e Angus), e também na raça Bonsmara, recomenda-se atrasar por 12 h a aplicação do agente indutor da ovulação (protocolo P-36/LH60).

## AGRADECIMENTOS:

Somos gratos aos Srs. Renato Eugênio de Rezende Barbosa e Paulo Fragnito (Agropecuária Campanário) por disponibilizarem o uso de animais para vários experimentos e a FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsas para M.F.G. Nogueira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFURAJI MM, ATKINSON T, BROADBENT PJ, HUTCHINSON JSM. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. *Anim Reprod Sci* 1993; 33: 99-109.
- ARMSTRONG DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993;39:7-24.
- BARCELOS ACZ, SATRAPA RA, NOGUEIRA MFG, BARROS CM. Protocolo superestimulatório P-36 na raça Bonsmara: uso de eCG e atraso na indução da ovulação com LH. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34 (supl.1): 514 (resumo).
- BARROS CM, NOGUEIRA MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1483-1496.
- BARROS CM, NOGUEIRA MFG. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter* 2005; 23: 5-9.
- BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BÓ GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 479-86.
- BARUSELLI PS, DE SÁ FILHO MF, MARTINS CM, NASSER LF, NOGUEIRA MFG, BARROS CM, BÓ GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 77-88.
- BELLOWS RA, STAIGMILLER RB, WILSON JM, PHELPS DA, DARLING A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology* 1991; 35: 1069-82.
- BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 895-907.
- BÓ GA, ADAMS GP, CACCIA M, MARTINEZ M, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 39: 193-204.
- BÓ GA, BARUSELLI PS, MARTINEZ MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sc.* 2003; 78: 307-326.
- BODENSTEINER KJ, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 1115-28.
- BOLAND MP, CROSBY TF, GORDON I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology* 1978; 10: 175.
- BOLAND MP, ROCHE JF. Embryo production: alternative methods. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 266-270.
- BRAILEANU GT, ALBANESE C, CARD C, CHEDRESE PJ. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology* 1998; 49: 1031-37.
- DIELEMAN SJ, BEVERS MM, GIELEN JTH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology* 1987; 27: 222.
- D'OCCHIO MJ, SUDHA G, JILELLA D, WHITE T, MACLELLAN LJ, WALSH J, TRIGG TE, MILLER D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce

- ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology* 1997; 47: 601-13.
- DONALDSON LE. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology* 1989; 31: 183.
- ELSDEN RP, HASLER JF, SEIDEL GE JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 1976; 6: 523.
- Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* 1994; 35: 158-62.
- GORDON I. Controlled reproduction in cattle & buffaloes. Cambridge: CAB Internacional, 1996. 492p.
- GOULDING D, WILLIAMS DH, DUFFY P, BOLAND MP, ROCHE JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 1990; 34: 767-78.
- GUIBAULT LA, GRASSO F, LUSSIER JG, ROULLIER P, MATTON P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 89.
- HILL BR, KUEHNER LF. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. *Theriogenology* 1996; 43: 324.
- LIU J, SIROIS J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod* 1998; 58: 1527-32.
- LOONEY CR, BONDIOLI KR. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* 1988; 29: 235.
- LUSSIER JP, LAMOTHE P, PACHOLEK X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 1995; 43: 270.
- MEIRELLES FV, ROSA AJM, LÔBO BR. Is the American Zebu really *Bos indicus*? *Genetics and Molecular Biology* 1999; 22: 543-47.
- NOGUEIRA MFG, BARROS BJP, TEIXEIRA AB, TRINCA LA, D'OCCHIO MJ, BARROS CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 2002; 57: 1625-34.
- Nogueira MFG, Barros CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Revista Acta Scientiae Veterinariae* 2003;31:509 (abstract).
- NOGUEIRA MFG & BARROS CM. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34(supl.1): 25-29.
- NOGUEIRA M.F.G., FRAGNITO P.S., TRINCA L.A., BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology*, 2006 (submitted).
- PINHEIRO OL, BARROS CM, FIGUEIREDO RA, VALLE ER, ENCARNAÇÃO RO, PADOVANI CR. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin  $F_2\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* 1998; 49: 667-81.
- ROBERTS AJ, GRIZZLE JM, ECHTERNKAMP SE. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology* 1994; 42: 917-29.
- ROWSON LEA, LAWSON RAS, MOOR RM, BAKER AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fertil.* 1972; 28: 427-31.
- STOCK AE, ELLINGTON JE, FORTUNE JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology* 1996; 45: 1091-1102.
- VAN DE LEEMPUT EE, VOS PLAM, HYTTEL P, VAN DEN HURK R, BEVERS MM, VAN DER WEIJDEN GC, DIELEMAN SJ. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology* 2001; 55: 573-92.
- XU Z, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, HAMILTON SA, YOUNGQUIST RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 1995; 53: 951-7.

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

ZANENGA CA, PEDROSA MF, LIMA GF, MARQUES MO, SANTOS ICC, VALENTIM R, BARUSELLI PS. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Acta Scientiae Veterinariae 2003; 31: 626-27.