

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

Ricardo Della M^ea

**IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO
DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM
FÊMEAS BOVINAS**

Santa Maria, RS

2021

Ricardo Della Mía

**IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO
DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM
FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programada de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Della Méa, Ricardo
Imunização anti-GnRH como um modelo para estudo da
suplementação exógena de gonadotrofinas em fêmeas bovinas
/ Ricardo Della Méa.- 2021.
53 p.; 30 cm

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves
Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Fisiologia do ciclo estrol 2. Alternativas para
suplementação de gonadotrofinas 3. Preparações para
liberação lenta de fármacos 4. Modelos de estudos para
suplementação exógeno de gonadotrofinas I. Dias Gonçalves,
Paulo Bayard II. Garziera Gasperin, Bernardo III. Título.

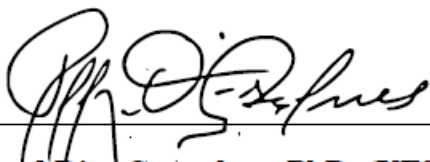
Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UPSEM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, RICARDO DELLA MÉA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM FÊMEAS BOVINAS

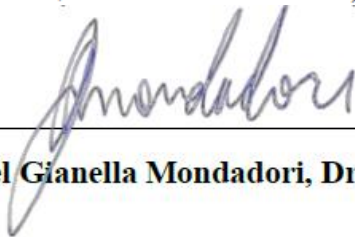
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 31 de agosto de 2021




Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD. (UFSM - UNIPAMPA)

(Presidente/Orientador)



Rafael Gianella Mondadori, Dr (UFPEL)



Juliana Germano Ferst, Dr. – (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS, 2021

DEDICATÓRIA

Dedico minha dissertação de mestrado primeiramente a Deus, a minha namorada e minha família. Dedico também ao meu orientador Paulo Bayard Dias Gonçalves e ao meu Coorientador Bernardo Garziera Gasperin, que muito fizeram por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir estar com saúde para conseguir traçar esse caminho.

Aos meus Pais, Luiz Roberto Della Méa e Marli Eleani Della Méa e a toda minha família por todo apoio, confiança e todo aporte necessário para conseguir chegar até aqui, nunca medindo esforços para tal.

A minha namorada Isabele Tobin Aita por todo apoio e companheirismo.

Ao meu orientador Paulo Bayard pela oportunidade de ter sido seu aluno, pela confiança depositada em mim, por todos ensinamentos e pela experiência conquistada estando ao seu lado.

Ao meu coorientador Bernardo Garziera Gasperin que além de professor foi um grande companheiro, exemplo de pessoa e comprometimento com aquilo que faz. Agradeço por toda ajuda nos experimentos, na escrita e com certeza, serei sempre grato ao senhor.

Ao Biorep e aos companheiros de Biorep pela convivência, parceria e respeito. Aos estagiários, pós graduandos, professores e colaboradores. Muito obrigado a todos.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realizar o mestrado e carregar seu nome junto comigo.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FAPERGS e FINEP por proporcionar as condições necessárias para a realização dessa pesquisa.

Sou muito grato a todos que de alguma forma estiveram junto comigo nesse período.

RESUMO

IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM FÊMEAS BOVINAS

AUTOR: Ricardo Della M^ea

ORIENTADOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

A suplementação de gonadotrofinas é necessária nas biotécnicas da reprodução. Em vacas no pós-parto, o uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) representa a única alternativa hormonal para estimular o crescimento folicular e aumentar as taxas de concepção. Alternativamente, o uso de FSH foi avaliado, porém, se mostrou ineficaz devido à curta meia-vida. Estudos utilizaram o modelo de vaca pós-parto para estudar a suplementação de gonadotrofinas. Alternativamente, implantes com agonistas de GnRH permitem inibir a atividade ovariana, limitando o crescimento dos folículos até 4 mm de diâmetro. A imunocastração com a vacina comercial anti-GnRH (Bopriva[®]) também pode representar um modelo, porém, se torna necessário testar sua viabilidade. Portanto, objetivou-se validar um modelo para estudar fontes alternativas de suplementação com gonadotrofinas. No experimento 1, oito vacas cíclicas adultas, receberam a vacina anti-GnRH em duas doses com um intervalo de trinta dias. Em seguida, as vacas foram separadas em três grupos experimentais: Grupo 1: 400UI de eCG, grupo 2: 50 mg FSH+Pluronic F127 e grupo 3: 50 mg FSH, sendo realizada avaliação da dinâmica folicular. No Experimento 2, seis vacas foram selecionadas, três cíclicas (grupo controle) e três em anestro induzido pelo uso de vacina anti-GnRH (grupo Bopriva). No D0, as vacas cíclicas receberam um implante vaginal contendo 1 g de progesterona e 2 mg de benzoato de estradiol I.M., enquanto as vacas do grupo Bopriva não foram tratadas. Cinco dias após (D5), o tratamento com FSH (Folltropin) foi iniciado em todas as vacas, administrado em oito aplicações decrescentes com um intervalo de 12 h, totalizando 200 mg FSH por vaca. Nas vacas cíclicas, 500 µg de cloprostenol sódico foram administrados no D8, quando foram retirados os implantes vaginais. No Experimento 3, foram utilizadas seis vacas imunocastradas com duas doses da vacina anti-GnRH. No D0, as vacas receberam 830 UI de eCG e implante de 1g de progesterona. Quarenta e oito horas depois (D2), foi administrada outra dose de 830 UI de eCG. No D6,5 do experimento a ovulação foi induzida pela administração de 1250 UI de hCG. No D9, a ovulação foi avaliada e coletas de sangue foram realizadas no D6,5 até o D14, para mensurar as concentrações de progesterona. No experimento 1, todas as vacas responderam ao tratamento com a vacina anti GnRH, observando-se apenas folículos com diâmetro inferior a 4 mm, mostrando eficácia da vacina. Porém, nenhum dos tratamentos com dose única induziu o crescimento folicular. No Experimento 2, todas as vacas responderam ao protocolo de superovulação com FSH, apresentando múltiplos folículos > 8 mm, comprovando a reversão do efeito vacinal. No experimento 3, após a segunda aplicação de eCG, quatro vacas responderam ao tratamento com pelo menos um folículo > 10 mm. Vacas que apresentaram folículos pré-ovulatórios responderam ao tratamento com hCG e ovularam, apresentando concentrações de progesterona acima de 20 ng/mL sete dias após o tratamento, demonstrando a funcionalidade dos corpos lúteos. Portanto, conclui-se que a imunocastração com vacina anti-GnRH pode ser utilizada como modelo para o estudo de alternativas para a suplementação exógena de gonadotrofinas em fêmeas bovinas.

Palavras-chave: Gonadotrofinas. Imunocastração. Vacina anti-GnRH

ABSTRACT**IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM FÊMEAS BOVINAS**

AUTHOR: Ricardo Della Méa

ADVISOR: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Gonadotropin supplementation is necessary in reproductive biotechnics. In postpartum cows, the use of equine chorionic gonadotropin (eCG) represents the only hormonal alternative to stimulate follicular growth and increase conception rates. Alternatively, the use of FSH was evaluated, however, it was shown to be ineffective due to the short half-life. Studies used the postpartum cow model to study gonatrophin supplementation. Alternatively, implants with GnRH agonists allow to inhibit ovarian activity, limiting the growth of follicles up to 4 mm in diameter. Immunocastration with the commercial anti-GnRH vaccine (Bopriva) can also represent a model, however, it becomes necessary to test its viability. Therefore, the objective was to validate a model to study alternative sources of gonadotropin supplementation. In experiment 1, eight adult cyclic cows received the anti-GnRH vaccine in two doses with an interval of thirty days. Then, the cows were separated into three experimental groups: Group 1: 400UI of eCG, group 2: 50 mg FSH+Pluronic F127 and group 3: 50 mg FSH, with an evaluation of the follicular dynamics. In Experiment 2, six cows were selected, three cyclic (control group) and three in anestrus induced by the use of anti-GnRH vaccine (Bopriva group). On D0, cyclic cows received a vaginal implant containing 1 g of progesterone and 2 mg of estradiol benzoate, while cows in the Bopriva group were not treated. Five days later (D5), treatment with FSH (Folltropin) was started in all cows, administered in eight decreasing applications with an interval of 12 h, totaling 200 mg FSH per cow. In cyclic cows, 500 µg of sodium cloprostenol was administered on D8, when the vaginal implants were removed. In Experiment 3, six cows were immunocastrated with two doses of the anti-GnRH vaccine. On D0, the cows received 830 IU of eCG and 1g of progesterone implant. Forty-eight hours later (D2), another dose of 830 IU of eCG was administered. On D6.5 of the experiment, ovulation was induced by administering 1250 IU of hCG. On D9, ovulation was assessed and blood samples were taken from D6.5 to D14 to measure progesterone concentrations. In experiment 1, all cows responded to treatment with the anti-GnRH vaccine, observing only follicles with a diameter less than 4 mm, showing the effectiveness of the vaccine. However, none of the single-dose treatments induced follicular growth. In Experiment 2, all cows responded to the FSH superovulation protocol, presenting multiple follicles > 8 mm, proving the reversal of the vaccine effect. In experiment 3, after the second application of eCG, four cows responded to treatment with at least one follicle > 10 mm. Cows that presented preovulatory follicles responded to treatment with hCG and ovulated, with progesterone concentrations above 20 ng/mL seven days after treatment, demonstrating the functionality of the corpus luteum. Therefore, it is concluded that immunocastration with anti-GnRH vaccine can be used as a model for the study of alternatives for exogenous gonadotropin supplementation in female bovine animals.

Keywords: Gonadotropins. Immunocastration. Anti-GnRH vaccin

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figura 1: Imagens representativas de: A) Ovário de vaca imunocastrada antes do tratamento com FSH; B) Ovário de vaca imunocastrada após 8 aplicações de FSH; C) Ovário de vaca cíclica após 8 aplicações de FSH.....42
- Figura 2: Número médio de folículos por ovário nos grupos controle e Bopriva no D8 do experimento, tendo o grupo Bopriva recebido doses decrescentes de FSH totalizando 200mg e o grupo controle administrado 500 µg de cloprostenol sódico e retirados os DIVs.....43
- Figura 3: Diâmetro folicular ao longo dos dias após os tratamentos com eCG (830 UI nos D2 e D4). Foram consideradas apenas as vacas responsivas aos tratamentos (n=4).....44
- Figura 4: Imagens ultrassonográficas de ovários representativas de: D2) Ovários duas semanas após a segunda aplicação de Bopriva e recebendo a primeira aplicação de eCG + implante de P4; D4) Ovários na segunda aplicação de eCG; D6,5) Ovários após as duas aplicações de eCG no momento da retirada do implante de P4 e da aplicação de hCG; D9) Ovários com folículos ovulados após a aplicação de hCG e corpos lúteos em formação, exceto nas vacas H118 e J117, que não responderam aos tratamentos com eCG e não foram tratadas com hCG.....45
- Figura 5: Concentração de progesterona ao longo dos dias após o tratamento com 1250 UI de hCG no D6,5. Foram consideradas apenas as vacas responsivas aos tratamentos (n=4).....46

LISTA DE TABELAS**ARTIGO**

Tabela 1. Diâmetro do maior folículo em vacas imunocastradas tratadas com gonadotrofinas exógenas, conforme os grupos eCG (400UI de eCG); FSH+pluronic (50 mg de FSH (Folltropin) + Pluronic F127); Grupo FSH (50 mg de FSH (Folltropin)).....	41
--	----

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL	15
2.2	ALTERNATIVAS PARA SUPLEMENTAÇÃO DE GONADOTROFINAS	16
2.3	PREPARAÇÕES PARA LIBERAÇÃO LENTA DE FÁRMACOS	17
2.4	MODELOS DE ESTUDOS PARA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENO DE GONADOTROFINAS	19
3	ARTIGO	22
4	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Com a compreensão da fisiologia do ciclo estral, medidas podem ser tomadas para controlar este evento, levando a melhorias da eficiência reprodutiva (BARUSELLI, P S et al., 2004; ROSSA et al., 2016). Os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) são amplamente utilizados, principalmente pela capacidade de aumentar a quantidade de fêmeas artificialmente inseminadas, sem necessidade de observação de estro (SÁ FILHO et al., 2011). A sincronização dos ciclos estrais permite encurtar a estação reprodutiva, ter uniformidade nos lotes de bezerros nascidos e maior facilidade do uso da inseminação artificial (IA). A IA é a técnica que permite a introdução de material genético com custo inferior à aquisição de reprodutores com alto padrão genético (LAMB et al., 2010).

O sucesso dos programas de IATF depende do crescimento do folículo ovulatório (FO) e do controle da ovulação (THEDY et al., 2018). O uso de estrógeno tem possibilitado a sincronização da emergência de uma nova onda folicular, quando associado à progesterona, por induzir a regressão folicular. Após a administração dessa associação, uma nova onda folicular se inicia entre o 3º e 4º dia (CACCIA; BÓ, 2003). A aplicação de estrógenos ocasiona, inicialmente, uma supressão na liberação tanto de FSH quanto de LH (MARTÍNEZ et al., 2007), levando à atresia dos folículos.

A partir dessa onda sincronizada, e na presença de um FD, formas de programar a ovulação incluem a indução farmacológica da luteólise, utilizando-se prostaglandina-F2 α (PGF) ou seus análogos sintéticos, a remoção do dispositivo contendo progesterona e um agente indutor da ovulação, para o qual comumente o estrógeno é utilizado (BINELLI et al., 2006). Sais de estrógenos, com meia-vida variada, têm sido utilizados em larga escala nos protocolos de IATF (MENEGHETTI et al., 2009). Na etapa final do processo que precede a ovulação, após o pico ovulatório do LH, o crescimento folicular está associado à maturação do oócito e, conseqüentemente, a sua capacidade de ser fecundado (SARTORI et al., 2001).

As relações entre o tamanho do FO, formação do corpo lúteo, a produção de progesterona e o desenvolvimento embrionário inicial estão associadas ao estabelecimento da prenhez em novilhas e vacas de corte. Diversos estudos relacionam o menor diâmetro do folículo ovulatório (FO) em vacas de corte sincronizadas para a IATF com a baixa condição nutricional durante o pós-parto (PERRY et al., 2007; ROCHE; CROWE; BOLAND, 1992). O anestro pós-parto é um dos principais fatores

que prolongam o intervalo parto-concepção nos sistemas de cria de bovinos de corte, ao passo que a relação vaca e bezerro é um importante fator que contribui no atraso ao retorno à ciclicidade após o parto, juntamente com a subnutrição (YAVAS; WALTON, 2000).

Estudos demonstraram que a administração de eCG no final do período de suplementação de progesterona aumenta a incidência de ovulação, uma vez que a eCG é capaz de estimular o crescimento final do folículo dominante, ligando-se a receptores de FSH e LH (BÓ; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, 2003). Alternativamente, o FSH é outra gonadotrofina que pode potencialmente ser usada para aumentar o crescimento folicular, porém estudos demonstraram a ineficácia quando aplicado em programas de IATF no momento da retirada do implante de progesterona (L.A. et al., 2010) (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Essa observação pode ser explicada pela menor meia-vida do FSH, em torno de 6 h, em comparação a eCG, que possui meia-vida entre 48 e 72 horas. Além disso, a eCG é capaz de se ligar aos receptores de LH, estimulando o crescimento folicular final (SALES et al., 2011).

Estudos visando aumentar a meia vida de fármacos demonstraram que Pluronic F127 em forma de gel pode sustentar e prolongar a liberação de GnRH e deslorelina no tecido muscular de bovinos. Além disso, quando formuladas em gel, tanto a deslorelina quanto o GnRH mantiveram sua atividade, como demonstrado pelas elevações de LH e progesterona observadas *in vivo*, aumentando o tempo para o pico de LH e melhorando o desenvolvimento folicular pré ovulatório (WENZEL et al., 2002).

Com base no acima exposto, fica evidente a necessidade de se estudar abordagens alternativas para promover o crescimento folicular. Modelos animais são fundamentais para a identificação de fármacos ou veículos que possam aumentar a meia-vida dos hormônios utilizados nas biotecnologias reprodutivas, especialmente das gonadotrofinas. Vacas no pós-parto representam um modelo adequado, pois apresentam deficiência de gonadotrofinas, especialmente LH, por períodos variáveis após o parto. Vacas paridas têm sido amplamente utilizadas em estudos investigando abordagens para estimular o crescimento folicular. Porém, o manejo desta categoria apresenta algumas restrições, como a necessidade de separação do bezerro para possibilitar a adequada condução e contenção da vaca. Além disso, há a necessidade de se obter gestações o mais cedo possível durante a temporada reprodutiva (CICCIOLI et al., 2003) (KRIEGSFELD et al., 2006) (STEVENSON et al., 1994), o que pode limitar testes de abordagens mais arriscadas que possam causar eventuais prejuízos à fertilidade. Foi

demonstrado que modelos utilizando implantes com agonistas de GnRH são adequados para estudar a foliculogênese, uma vez que limitam, de forma reversível, o crescimento dos folículos a partir de 2 a 4mm de diâmetro. Entretanto, os referidos implantes não estão disponíveis comercialmente no Brasil (D'OCCHIO et al., 2000).

O presente estudo tem como objetivo validar um modelo de supressão do crescimento folicular utilizando a imunocastração com vacina anti-GnRH para, posteriormente, testar a reversão da inibição do crescimento folicular com a suplementação exógena de gonadotrofina. Assim, pretende-se validar um modelo para o estudo de aspectos básicos da foliculogênese e para o desenvolvimento de abordagens inovadoras para uso nas biotécnicas da reprodução, como a identificação de diferentes veículos que possam aumentar a meia-vida do FSH.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de duas a três ondas de crescimento folicular. Cada uma dessas ondas é oriunda da ovulação do folículo dominante da onda anterior, ou de sua atresia. Sendo assim, o efeito do *feedback* negativo que o estradiol e a inibina secretados pelo folículo dominante, exercem sobre o hormônio folículo estimulante (FSH, do inglês, *Follicle-stimulating hormone*) se encerra (BINELLI et al., 2006). Então, um pool de pequenos folículos são recrutados durante a fase de emergência folicular, pelo estímulo do FSH, e iniciam uma fase de crescimento por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Após o processo chamado de divergência folicular, apenas um, o folículo dominante (FD), continua a se desenvolver, enquanto os demais, folículos subordinados, entram em atresia.

Uma maior atividade das proteases específicas para a proteína de ligação semelhante a insulina (IGFBP, do inglês *Insulin-like growth factor binding-protein*) está presente no folículo dominante, em comparação aos subordinados, regulando o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF, do inglês *Insulin-like growth factor*). Isso, provavelmente, potencializa ou permite a ação das gonadotrofinas em estimular o crescimento e diferenciação folicular (FORTUNE; RIVERA; YANG, M. Y., 2004), apresentando mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo da gonadotrofina hipofisária, o hormônio luteinizante (LH, do inglês *Luteinizing hormone*) (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2001). Em resposta ao LH, o folículo que foi selecionado segue o crescimento e aumenta sua capacidade de produzir estradiol (E2) e inibina, levando a concentração de FSH a retornar aos níveis basais, e o folículo selecionado se torna dominante (GINTHER et al., 1999).

O crescimento do FD é maior quanto maior for a frequência de liberação dos pulsos de LH, sendo controlada diretamente pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH, do inglês *Gonadotropin-releasing hormone*) (KARSCH et al., 1997). Durante a fase luteínica ou progesterônica do ciclo estral, a frequência de pulsos de LH não é suficiente para o crescimento final e a ovulação do folículo dominante, devido a concentrações elevadas de progesterona circulante.

Por outro lado, na ausência de progesterona, na fase folicular do ciclo estral, o estrógeno induz aumento na frequência e diminuição da amplitude de liberação de GnRH, levando a um pico de LH, que irá culminar na ovulação do folículo dominante. O folículo ovulado passa por mudanças funcionais e estruturais para se tornar o corpo lúteo, que se desenvolve rapidamente, secretando quantidades crescentes de progesterona (BINELLI et al., 2006).

2.2 ALTERNATIVAS PARA SUPLEMENTAÇÃO DE GONADOTROFINAS

Conforme mencionado anteriormente, as gonadotrofinas são essenciais para o adequado desenvolvimento folicular. Entretanto, em algumas situações, como durante o período pós-parto, as fêmeas bovinas apresentam deficiência de gonadotrofinas, especialmente de LH, por períodos variados. Para suplementação exógena de gonadotrofinas, dois hormônios são comumente utilizados, o FSH e a eCG. A eCG é uma glicoproteína sintetizada a partir dos cálices endometriais de éguas gestantes e tem a função de induzir a formação de CLs acessórios e luteinização de folículos durante a gestação na égua. O pico de produção dessa glicoproteína ocorre entre os dias 55 e 70 da gestação e sua concentração declina próximo dos 130 dias (MURPHY; MARTINUK, 1991). A subunidade α dos hormônios LH e FSH são iguais, sendo que a eCG é dotada dessa mesma subunidade α , o que faz esse hormônio ligar-se tanto nos receptores de LH quanto de FSH (PIERCE; PARSONS, 1981)

A eCG contém ácido siálico, principalmente na subunidade β , que confere ao hormônio uma meia-vida longa de 26 h em equinos (COLE et al., 1967), maior que a meia-vida de FSH e LH. A eCG tem a meia-vida mais longa na circulação bovina em comparação com as gonadotrofinas LH e FSH (MENZER; SCHAMS, 1979), porque sua molécula possui oligossacarídeos altamente sializados (DAMM et al., 1990), que reduzem o metabolismo e a filtração de eCG no fígado e nos rins (MARTINUK et al., 1991). A eCG tem afinidade aos receptores do LH (LHCGR), e FSH (FSHR), que pertencem a uma subfamília de receptores de hormônios glicoproteicos que incluem sete receptores de domínio transmembrana associados à proteína G (DUFAU, 1998). Conseqüentemente, a eCG pode determinar e desenvolver as atividades de LH e FSH em espécies não equídeas (BAKER, 1973; COLE et al., 1967; STEWART; ALLEN,

1981) devido a uma alta afinidade para os receptores FSH e LH. Devido a isso, a eCG é utilizada em medicina veterinária para controlar a atividade reprodutiva em bovinos.

A eCG tem sido utilizada em protocolos de IATF em bovinos para melhorar o crescimento folicular e assim produzir um folículo maior e mais responsivo para o período ovulatório (SIQUEIRA, L. C. *et al.*, 2009). Em protocolos de IATF para bovinos de corte com alta incidência de anestro pós-parto, a eCG é administrada concomitantemente à remoção de um dispositivo intravaginal que libera progesterona, para estimular o crescimento do folículo dominante antes da ovulação (BARUSELLI, P. S. *et al.*, 2004; SMALL *et al.*, 2009) resultando em melhora nas taxas de prenhez (ROSS *et al.*, 2004).

O FSH, é um hormônio regulado pelo peptídeo GnRH, sendo o principal hormônio endócrino que controla o crescimento folicular antral precoce e o surgimento de cada nova onda de crescimento folicular (ADAMS *et al.*, 1992; SUNDERLAND *et al.*, 1993). O mecanismo pelo qual o FSH induz o desenvolvimento folicular é mediado por um maior número de receptores de FSH nas células da granulosa (FORTUNE *et al.*, 2005). Isso é seguido por uma queda nas concentrações de FSH durante a seleção, com as concentrações de FSH atingindo níveis basais durante a fase inicial de dominância (SUNDERLAND *et al.*, 1993).

O FSH é outra gonadotrofina que pode potencialmente ser usada para aumentar o crescimento folicular, porém, conforme mencionado anteriormente, é ineficaz em protocolos de IATF (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Sua meia vida curta é a explicação para ausência de efeito sobre o crescimento folicular. Além disso, o FSH purificado não tem atividade semelhante ao LH, ao contrário da eCG (SALES *et al.*, 2011). Nesse contexto várias aplicações de FSH não se tornam práticas em protocolos de IATF, fazendo com que se torne necessário buscar alternativas para essa condição.

2.3 PREPARAÇÕES PARA LIBERAÇÃO LENTA DE FÁRMACOS

A preparação de fármacos com veículos de liberação lenta é uma alternativa que pode ter aplicabilidade prática, uma vez que aumentando a meia-vida do fármaco é possível utilizá-lo em doses reduzidas. O aumento da meia-vida circulante do FSH poderia viabilizar seu uso em protocolos de IATF, ou até mesmo em protocolos de superovulação, com menor número de aplicações.

Os plurônicos são uma série de copolímeros em bloco, que estão a disposição comercialmente com propriedades que variam. Destes, o Pluronic F127 (PF127) é um copolímero tribloco do tipo ABA, sendo formado de unidades de polioxietileno (A) e unidades de polioxipropileno (B) (BHARDWAJ; BLANCHARD, 1996). Interessantemente, o PF127 em concentrações de 20% ou mais em solução aquosa exibe a propriedade única da gelificação térmica, reversível à temperatura ambiente (25°C). O PF127 existe como um líquido viscoso móvel, que é transformado em um gel à temperatura do corpo (cerca de 37°C). Assim, é possível originar uma formulação com PF127 que é líquida a temperaturas mais baixas, porém quando injetada, proporciona um depósito de fármaco no local da injeção em forma de gel. Tal formulação de depósito de PF127 já foi usada para sustentar a liberação prolongada de proteínas biologicamente ativas como interleucina-2 e urease (JOHNSTON, Thomas P.; PUNJABI; FROELICH, 1992).

Além disso, descobriu-se que o PF127 aumenta a estabilidade da urease, interleucina-2 (WANG; JOHNSTON, T P, 1993) e do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) (KATAKAM; BELL; BANGA, 1995). Estudos demonstraram que o Pluronic F-127 aumenta a adesão celular e a formação de colágeno, levando a melhores níveis de angiogênese (FOWLER et al., 2005) e possui propriedades favoráveis, como não ser tóxico, ter biocompatibilidade e biodegradabilidade. Uma característica única do Pluronic F-127 é a de ser termo sensível, que permite a retenção de células em forma de cápsulas em sua estrutura e favorece a adesão inicial de células (HUANG, J. et al., 2006) (CHEN, W. J. et al., 2009)

A baixa temperatura, o PF127 existe como subunidades micelares e com um aumento de temperatura sofre transformação em gel, formando uma rede reticulada que é capaz de proteger os fármacos proteicos da degradação, liberando esses fármacos da rede reticulada de maneira lenta, permitindo a administração prolongada de medicamentos (ATTWOOD; COLLETT; TAIT, 1985). Estudos demonstraram que PF127 em forma de gel pode sustentar e prolongar a liberação de GnRH e deslorelina no tecido muscular de bovinos. Além disso, quando formuladas em gel, tanto a deslorelina quanto o GnRH mantiveram sua atividade, como demonstrado pelas elevações de LH e progesterona observadas in vivo, aumentando o tempo para o pico de LH e melhorando o desenvolvimento folicular pré ovulatório (WENZEL et al., 2002). A

liberação do fármaco a partir de géis plurônicos pode ser ainda mais controlada pela incorporação de aditivos hidrofílicos ou hidrofóbico (MORISHITA et al., 2001).

A álcool polivinílico (PVA) é um material com boa estabilidade química, termo-estável e altamente permeável à água. O PVA tem sido amplamente utilizado em fibras, adesivos, emulsificantes, em aplicações na indústria têxtil e de papel, como protetor de coloide (OKAYA; SUZUKI; KIKUCHI, 1999). Mais recentemente, o PVA tem sido utilizado como carreador de medicamento, devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxicidade. Algumas aplicações visam alterar a permeabilidade a gases, aumentar a processabilidade e a resistência térmica (BATYRBKOV, E. O.; ISKAKOV, R. & ZHUBANOV, B. A, 1998), também melhorar a capacidade de estabilização, a biocompatibilidade, a permeabilidade e a biodegradabilidade de soluções (GNANOU; FONTANILLE, 2007). A versatilidade do PVA é um importante agregado para a formulação de novos materiais funcionais e hidrogéis com potenciais, como a viabilidade de abordagens sintética para a obtenção de parâmetros adequados para a liberação controlada de medicamentos (PARADOSSI et al., 2003).

Os produtos acima citados possuem potencial para uso no controle da liberação de hormônios reprodutivos. A identificação de alternativas para aumentar a meia vida de hormônios, como o FSH, poderia impactar positivamente no bem-estar animal, uma vez que esta gonadotrofina pode ser obtida em abatedouro, não sendo necessária a manipulação de animais vivos.

2.4 MODELOS DE ESTUDO PARA SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENO DE GONADOTROFINAS

2.4.1 Modelo de agonista de GnRH

Os implantes com agonistas de GnRH contêm o agonista deslorelina (ANALOGS, 1986). Os implantes possuem uma matriz de lipídeos extrudada contendo agentes formadores de poros solúveis que são biocompatíveis e foram formulados para conter 12 mg de deslorelina por implante. Um único implante normalmente suprime a função ovariana em novilhas por 12 meses, ao passo que o implante é colocado subcutaneamente na superfície dorsal da orelha (OCCHIO, Michael J D et al., 2002).

Os agonistas de GnRH, em comparação com o GnRH natural, têm uma afinidade maior com os receptores de GnRH e uma meia-vida mais longa circulante. Essas propriedades dos agonistas do GnRH possibilitam a utilização em doses substancialmente mais baixas (ANALOGS, 1986). A resposta ao tratamento crônico com agonista de GnRH tem dois componentes, a fase aguda do tratamento, que pode durar vários dias, é caracterizada por um grande aumento imediato de LH e FSH plasmático, seguido por um retorno às concentrações basais (GONG et al., 1995). A exposição contínua ao agonista GnRH leva a uma fase crônica a qual a secreção pulsátil de LH é bloqueada (OCCHIO, Michael J D; ASPDEN, William J; WHYTE, Tim R, 1993). Esse bloqueio ocorre devido a uma regulação negativa dos receptores de GnRH nas células gonadotróficas (AL, 1986) (HAZUM; CONNF, 1988). Como consequência, o crescimento folicular em novilhas implantadas por um longo período com um agonista de GnRH é interrompido no estágio folicular antral com diâmetro do folículo de 2 a 4 mm (OCCHIO, M J D et al., 2000).

Esse modelo de novilhas implantadas por um longo período com um agonista de GnRH, responde à estimulação aguda com FSH, apresentando padrões de crescimento folicular e ovulação semelhantes aos de novilhas normais (D'OCCHIO et al., 2013). Portanto, fornece um modelo importante para estudar suplementação de gonadotrofina para o crescimento folicular final e ovulação. Contudo, esse modelo não está disponível comercialmente no Brasil, o que limita seu uso, fazendo necessário buscar alternativas disponíveis e de custo acessível.

2.4.2 Modelo de vacina anti-GnRH

A vacina anti-GnRH é uma potencial ferramenta para o estudo de alternativas para suplementação de gonadotrofinas, visto que é disponível comercialmente, tem um custo acessível e é indicado para uso em bovinos. A vacina Bopriva é um imunocastrador para bovinos, sendo composta de um análogo de GnRH ligado à uma proteína carreadora, ao passo que é adicionado à vacina um adjuvante sintético aquoso que aumenta o nível e duração da imunidade (Bopriva – Zoetis, São Paulo, Brasil).

A vacina anti-GnRH suprime imunologicamente de forma temporária a função ovariana, resultando na supressão dos níveis de estrógeno e progesterona nas fêmeas

bovinas adultas a partir dos 15 meses. A atividade normal do ciclo estral começa a diminuir ou cessa em aproximadamente 2 semanas após aplicação da 2ª dose do produto, onde os títulos de anticorpos atingem o seus maiores níveis (HIRSBRUNNER et al., 2017)

As vacinas anti-GnRH foram elaboradas e tornaram-se comercialmente disponível para uso em bovinos, principalmente para imunocastração, como uma alternativa para a castração cirúrgica convencional, preservando o bem-estar animal (MARTI et al., 2015). A imunização contra o GnRH induz uma diminuição na frequência e amplitude dos pulsos de LH e também reduz as concentrações médias de FSH aos níveis basais (FINNERTY; ENRIGHT; ROCHE, 1998).

O uso da vacina anti-GnRH como modelo de estudo de suplementação exógena de gonadotrofinas ainda é uma incógnita, visto que a capacidade de reversão dos folículos nunca foi testada. Estudos recentes mostraram que a imunização ativa contra GnRH é uma alternativa terapêutica potencial para controlar cistos foliculares de vacas doadoras de oócitos submetidas a repetidas seções de OPU e que desenvolveram doença cística ovariana crônica. Os cistos regridem após a imunização, possibilitando o crescimento de pequenos folículos (<4 mm), sem afetar o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* (VIANA et al., 2021). No referido estudo, os autores relatam atraso na emergência folicular em vacas imunocastradas, em comparação com vacas cíclicas. Portanto, a suplementação exógena com gonadotrofinas poderia representar uma ferramenta para controlar o crescimento folicular nas vacas imunocastradas. Assim, além de estabelecer a viabilidade de um modelo de estudo, a suplementação de gonadotrofinas em vacas imunocastradas pode ter uma aplicação prática.

3 ARTIGO

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

IMUNIZAÇÃO ANTI-GnRH COMO UM MODELO PARA ESTUDO DA
SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE GONADOTROFINAS EM FÊMEAS
BOVINAS

Ricardo Della Méa, Bernardo Garziera Gasperin, Jéssica Lazzari, Monique Tomazele

Rovani, Arnaldo Diniz Vieira, Rogério Ferreira, Paulo Bayard Dias Gonçalves

1 **Vacina anti-GnRH como um modelo para estudo da suplementação exógena**
2 **de gonadotrofinas em fêmeas bovinas**

3 **Anti-GnRH vaccine as a model for studying exogenous gonadotropin**
4 **supplementation in cattle**

5 **Ricardo Della M¹á** **J²éssica Lazzari** **Monique Tomazele Rovani**³

6 **Arnaldo Diniz Vieira**² **Rafael Gianella Mondadori**² **Rog⁴ério Ferreira**

7 **Paulo Bayard Dias Gon⁵çalves** **Bernardo Garziera Gasperin**^{2*}

8 **RESUMO**

9 A imunocastração com vacina anti-GnRH pode representar um modelo de supressão da
10 atividade ovariana para estudos da foliculogênese, porém, a viabilidade desse modelo
11 ainda não foi avaliada. No Experimento 1, seis vacas imunocastradas foram separadas
12 em três grupos: Grupo 1: 400UI de eCG; grupo 2: 50 mg FSH (Folltropin) + Pluronic
13 F127 e grupo 3: 50 mg FSH. No Experimento 2, seis vacas foram selecionadas, sendo
14 três cíclicas (grupo controle) e três imunocastradas. As vacas receberam oito aplicações
15 decrescentes de FSH com um intervalo de 12 h, totalizando 200 mg FSH por vaca. No
16 Experimento 3 vacas imunocastradas (n=6) receberam 830 UI de eCG no D0 e no D2.
17 No D6.5, com a presença de folículos pré-ovulatórios, a ovulação foi induzida com
18 1250 UI de hCG. No Experimento 1, todas as vacas responderam ao tratamento com a
19 vacina anti-GnRH, observando-se apenas folículos menores que 4 mm e ausência de
20 corpo lúteo. Entretanto, uma dose de gonadotrofina não foi capaz de induzir o
21 crescimento folicular. No Experimento 2, duas vacas de cada grupo responderam ao
22 protocolo de superovulação, com múltiplos folículos maiores de 8 mm ao final do
23 tratamento com FSH. No Experimento 3, após a segunda aplicação de eCG, quatro

^{1*}Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. Santa Maria, RS - Brasil E-mail: ricardodellamea10@gmail.com. Autor para correspondência.

²Universidade Federal de Pelotas, UFPEL. Pelotas, RS - Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS - Brasil.

⁴Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC. Lajes, SC- Brasil.

⁵Universidade federal da Pampa, UNIPAMPA. Uruguaiana, RS, Brasil.

1 vacas responderam ao tratamento (folículos maiores que 10 mm). As quatro vacas
2 responderam ao tratamento com hCG e ovularam, o que foi confirmado com
3 concentrações de progesterona acima de 20 ng/mL indicando a funcionalidade dos
4 corpos lúteos. Conclui-se que o modelo utilizado é adequado para o estudo da
5 foliculogênese.

6 **Palavras chave:** Vacina anti-GnRH, imunocastração, gonadotrofinas exógenas

7 **ABSTRACT**

8 Immunocastration with anti-GnRH vaccine may represent a model of suppression of
9 ovarian activity; however, so far, the feasibility of this model has not been evaluated. In
10 experiment 1, six immunocastrated cows were allocated into three experimental groups:
11 group 1: 400IU eCG; group 2: 50 mg FSH+pluronic F127 and group 3: 50 mg FSH. In
12 experiment 2, six cows were selected, three cyclic (control group) and three
13 immunocastrated. The cows received eight descending applications of FSH with an
14 interval of 12 h, totaling 200 mg FSH per cow. In experiment 3, immunocastrated cows
15 (n=6) received 830 IU of eCG on D0 and D2. On D6.5, with the presence of
16 preovulatory follicles, ovulation was induced by administering 1250 IU of hCG. In
17 experiment 1, all cows responded to treatment with the anti-GnRH vaccine, observing
18 only follicles with a diameter less than 4 mm and absence of corpus luteum. However, a
19 single dose of gonadotropin was not able to induce follicular growth. In experiment 2,
20 two cows from each group responded to the superovulation protocol, with multiple
21 follicles larger than 8 mm observed at the end of FSH treatment. In experiment 3, after
22 the second application of eCG, four cows responded to treatment (at least one follicle
23 larger than 10 mm). The four cows responded to hCG treatment and ovulated, which
24 was confirmed by progesterone concentrations above 20 ng/ml indicating functional

1 corpora lutea. It is concluded that the model used is suitable for the study of
2 folliculogenesis.

3

4 **Key words:** Anti-GnRH vaccine, immunocastration, exogenous gonadotropins

5

6 **INTRODUÇÃO**

7 Com a compreensão da fisiologia do ciclo estral, diversas biotécnicas foram
8 desenvolvidas, levando a melhorias da eficiência reprodutiva, sendo a suplementação de
9 gonadotrofinas amplamente utilizada no controle do ciclo estral em bovinos
10 (BARUSELLI, P. S. et al., 2004; ROSSA et al., 2016). A principal categoria que
11 necessita da suplementação de gonadotrofinas é vacas no pós-parto, uma vez que o
12 anestro lactacional é um dos principais fatores que prolongam o intervalo parto-
13 concepção nos sistemas de cria de bovinos de corte (YAVAS; WALTON, 2000). Ainda,
14 a suplementação de gonadotrofinas é necessária para promover a superovulação (SOV)
15 (LUCIA, 1997).

16 A gonadotrofina coriônica equina (eCG), administrada antes ou no momento da
17 remoção do dispositivo intravaginal com progesterona, tem sido amplamente utilizada
18 em bovinos de corte (SIQUEIRA, L. C. et al., 2009). A eCG é utilizada em protocolos
19 de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), para estimular o crescimento do
20 folículo dominante antes da ovulação (BARUSELLI, P. S. et al., 2004; SMALL et al.,
21 2009). Já para a SOV, o tratamento com eCG, apesar de prático (uma aplicação),
22 apresenta limitações, como o desenvolvimento de estruturas anovulatórias e embriões
23 de baixa qualidade.

24 Estudos avaliaram o uso do hormônio folículo estimulante (FSH) como uma
25 alternativa a eCG, para estimular o crescimento folicular (FORTUNE et al., 2005;

1 SALES et al., 2011). Porém, a maioria dos dados disponíveis na literatura demonstram a
2 ineficácia do FSH quando utilizado em dose única em protocolos de IATF em vacas no
3 pós-parto (L.A. et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2010), o que pode ser explicado pela
4 meia-vida curta do FSH. Além disso, ao contrário da eCG, o FSH purificado não possui
5 ação similar ao LH (SALES et al., 2011), o que é importante para o crescimento
6 folicular final. Estudos visando aumentar a meia vida de fármacos utilizaram o Pluronic
7 F127 em forma de gel, o qual prolonga e sustenta a liberação de GnRH no tecido
8 muscular de bovinos. Nessa formulação o GnRH aumenta sua atividade, elevando
9 níveis de LH e progesterona observadas in vivo, aumentando o tempo para o pico de LH
10 e melhorando o desenvolvimento folicular pré ovulatório (WENZEL et al., 2002).
11 Sendo uma plausível alternativa para aumentar a meia vida circulante do FSH.

12 Para investigar alternativas para suplementação de gonadotrofinas, diversos
13 estudos utilizaram o modelo de vacas no pós-parto. Entretanto, o manejo dessa categoria
14 é complicado, pois requer a separação dos bezerros, além do fato de que as fêmeas
15 devem se tornar gestantes o mais cedo possível na estação reprodutiva (CICCIOLI et
16 al., 2003; KRIEGSFELD et al., 2006; STEVENSON et al., 1994). Alternativamente, o
17 uso de implantes de agonista de GnRH (Deslorelina-12 mg) (D'OCCHIO et al., 2013)
18 possibilita a inibição da atividade ovariana, limitando o crescimento dos folículos a
19 partir de 2 - 4mm de diâmetro (D'OCCHIO et al., 2000). O modelo é adequado para
20 estudos envolvendo regulação da foliculogênese, uma vez que os animais tratados
21 respondem ao tratamento com FSH exógeno, em comparação com fêmeas cíclicas, não
22 tratadas. Entretanto, implantes com agonista de GnRH não estão disponíveis
23 comercialmente no Brasil. Assim, a imunocastração com vacina comercial anti-GnRH
24 (Bopriva - Zoetis Brasil) poderia representar um modelo de supressão de atividade
25 ovariana (HIRSBRUNNER et al., 2017), ao passo que a imunização ativa contra o

1 GnRH diminui a frequência e amplitude dos pulsos de LH e reduz as concentrações
2 plasmáticas de FSH a níveis basais (FINNERTY; ENRIGHT; ROCHE, 1998).

3 Resultados de estudos utilizando a imunização anti-GnRH como alternativa
4 terapêutica mostraram que, ao utilizar a vacina em vacas doadoras de oócitos com
5 doença cística ovariana crônica, obteve-se uma redução de cistos foliculares, não
6 observando qualquer efeito prejudicial ao potencial desenvolvimento dos oócitos *in*
7 *vitro* (VIANA et al., 2021). Os autores relatam que vacas imunocastradas apresentam
8 um atraso na emergência folicular após cada seção de *ovum pick-up* (OPU). Portanto, a
9 indução do crescimento folicular utilizando gonadotrofinas exógenas poderia auxiliar no
10 controle das ondas foliculares nesses animais.

11 Com base no exposto, este estudo teve como objetivo validar um modelo para
12 estudar a foliculogênese, com foco em fontes alternativas de suplementação de
13 gonadotrofinas. Para isso, testou-se a viabilidade do modelo de imunocastração com
14 vacina anti-GnRH para inibir o desenvolvimento de folículos dependentes de
15 gonadotrofinas para, posteriormente, testar a reversão com a suplementação exógena de
16 gonadotrofina. Ainda, objetivou-se testar a capacidade de ovulação e formação de
17 corpos lúteos de folículos estimulados exclusivamente com gonadotrofinas exógenas.

18

19 MATERIAL E MÉTODOS

20 *Experimento 1 – Avaliação de diluente para aumentar a meia-vida do FSH*

21 Seis vacas adultas cíclicas, das raças Holandês e Jersey, receberam a vacina anti-
22 GnRH Bopriva (Zoetis; Austrália) em duas doses (400 µg de GnRH-proteína
23 conjugada) com intervalo de trinta dias. Após duas semanas da dose de reforço, os
24 animais foram submetidos a exame ultrassonográfico para avaliação da atividade
25 ovariana, sendo observado que os animais se encontravam em anestro (ausência de

1 corpo lúteo e folículos com diâmetro inferior a 4 mm). Após, as vacas foram separadas
2 em três grupos experimentais: Grupo eCG: 400UI de eCG; Grupo FSH+pluronic: 50 mg
3 de FSH (Folltropin) + Pluronic F127 (grupo FSH + Pluronic F127); Grupo FSH: 50 mg
4 de FSH (Folltropin) (grupo FSH). Uma mistura para liberação prolongada de FSH foi
5 preparada conjugando esse hormônio ao Pluronic F127, sendo adotado o método frio
6 para a preparação do gel. O Pluronic F127 (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados
7 Unidos) foi diluído a 20% em solução salina fosfatada e tamponada (PBS) e estocado na
8 geladeira (4 a 6°C) por 12 horas para sua diluição total. Após a refrigeração, o composto
9 formado foi misturado com álcool polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich Chemical Co,
10 Estados Unidos) em uma concentração de 2%. Uma vez misturado, permaneceu
11 armazenado na geladeira entre 4 e 6 °C até 24 horas antes do momento do uso, quando
12 foi adicionado o hormônio FSH, homogeneizado e armazenando (4 a 6°C) até o
13 momento da administração. No momento do tratamento e 24, 48 e 72 h após foi
14 realizado o exame ultrassonográfico dos ovários, visando avaliar o desenvolvimento
15 folicular.

16 *Experimento 2 – Reversão da imunocastração com FSH*

17 Foram selecionadas 6 vacas da raça Holandesa com idade entre 4 e 7 anos e peso
18 aproximado de 600 kg, não lactantes, sendo três cíclicas (grupo controle) e três em
19 anestro induzido pela utilização de vacina anti-GnRH (grupo Bopriva), conforme
20 descrito anteriormente. No D0, as vacas cíclicas receberam um dispositivo intravaginal
21 (DIV) contendo 1 g de progesterona (DIB – Zoetis) e 2 mg de benzoato de estradiol
22 (Gonadiol – Zoetis), enquanto as vacas do grupo Bopriva não foram tratadas. Cinco dias
23 após (D5), foi iniciado o tratamento com FSH, em todas as vacas, sendo administrado
24 em oito aplicações decrescentes de Folltropin (Vetoquinol, Brasil) com intervalo de 12
25 h (duas doses diárias de 33,3 mg, 27,7 mg, 22, 2 mg e 16,7 mg, respectivamente),

1 totalizando 200 mg de FSH por vaca. Nas fêmeas cíclicas, foi administrado 500 µg de
2 cloprostenol sódico (Estron; Tecnopec) no D8, quando foram retirados os DIVs. As
3 vacas foram avaliadas por ultrassonografia a cada 48 h durante o período de tratamento
4 com FSH.

5 *Experimento 3 - Reversão da imunocastração com eCG*

6 Foram selecionadas seis vacas cíclicas, que receberam a vacina anti-GnRH
7 (Bopriva) em intervalos de 30 dias entre uma aplicação e outra. Após 15 dias da
8 segunda aplicação, as vacas foram avaliadas através de ultrassonografia, não sendo
9 constatada atividade ovariana e presença de folículos menores de 4 mm. No D0, as
10 vacas receberam 830 UI de eCG (Novormon – Zoetis) e DIV com 1 g de progesterona
11 (DIB – Zoetis); 48 h após, no D2, receberam outra dose de 830 UI de eCG. Foi
12 realizada avaliação ultrassonográfica dos ovários a cada 24 ou 48 h para avaliação do
13 crescimento folicular. No D6,5 do experimento, nos animais que apresentavam folículos
14 pré-ovulatórios, foi induzida a ovulação com aplicação de 1250 UI de hCG (Chorulon –
15 MSD Saúde Animal). No D9, foi avaliada a ovulação dos folículos através da
16 ultrassonografia. A presença de corpos lúteos foi avaliada nos D11 e D14. As coletas de
17 sangue foram realizadas inicialmente no D6,5 e prosseguiram até o D14, para
18 mensuração dos níveis de progesterona circulantes, por um laboratório especializado.

19 *Análise estatística*

20 No experimento 3, o diâmetro folicular e a concentração de progesterona foram
21 avaliados ao longo do tempo por modelos mistos para dados repetidos. O efeito do dia
22 foi incluído como efeito fixo no modelo e a vaca como a unidade experimental.
23 Diferentes estruturas de covariância foram avaliadas e utilizado "Compound Symmetry
24 Unequal Variances" e "Unequal Variances", respectivamente para diâmetro folicular e
25 concentração de progesterona, pois os modelos apresentaram menor Critério de

1 Informação de Akaike (AIC). A diferença entre os dias foi determinada pelo teste de
2 Tukey HSD. A distribuição normal dos resíduos foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk
3 W. As análises foram realizadas utilizando o software JMP, sendo adotado um nível de
4 significância de 5%.

5

6 **RESULTADOS**

7 *Experimento 1 - Avaliação de diluente para aumentar a meia-vida do FSH*

8 Todas as vacas tratadas com Bopriva (100%; 6/6) responderam ao tratamento,
9 sendo observados apenas folículos com diâmetro inferior a 4 mm e ausência de corpo
10 lúteo. Uma vaca apresentou uma estrutura cística no ovário, com diâmetro de 13 mm, a
11 qual persistiu após repetidas avaliações. Após o tratamento com gonadotrofinas, todas
12 as vacas apresentaram folículos com diâmetro inferior a 6 mm, indicando que a
13 suplementação de gonadotrofinas, nas doses utilizadas, não foi suficiente para promover
14 o crescimento folicular (Tabela 1).

15 *Experimento 2 - Reversão da imunocastração com FSH*

16 Previamente ao tratamento, as vacas do grupo Bopriva apresentavam apenas
17 folículos menores que 4 mm. Duas vacas de cada grupo responderam ao protocolo de
18 superovulação, apresentando múltiplos folículos maiores que 8 mm (Figura 1). Foi
19 observado número médio de folículos por ovário de $13,8 \pm 3$ e $11,2 \pm 3,2$ nos grupos
20 controle+FSH e Bopriva+FSH, respectivamente (Figura 2), demonstrando que os
21 animais imunocastrados responderam a estimulação com FSH de maneira similar aos
22 animais cíclicos.

23 *Experimento 3 - Reversão da imunocastração com eCG*

1 Todas as vacas (100% 6/6) responderam ao tratamento com a Bopriva,
2 apresentando somente folículos menores que 4 mm, com exceção de um animal que
3 apresentava uma estrutura cística, que permaneceu estática ao longo do período. Após a
4 segunda aplicação de eCG, quatro vacas responderam ao tratamento apresentando no
5 mínimo um folículo maior que 10 mm no D6,5. Considerando apenas as vacas que
6 responderam ao eCG, não foi observada diferença significativa no diâmetro folicular em
7 D0 e D2. Em D4, D5 e D6,5, observou-se um aumento significativo no diâmetro do
8 maior folículo de cada vaca ($P < 0,05$; Figura 3). O número médio de folículos $> 5\text{mm}$ no
9 D6,5 foi $6,5 \pm 2$ e $6,8 \pm 2$ nos ovários esquerdo e direito, respectivamente. Na avaliação no
10 D9, todas as quatro vacas responderam ao tratamento com hCG e ovularam (Figura 4).
11 As ovulações repercutiram em corpos lúteos funcionais, uma vez que as quatro vacas
12 apresentaram concentração de progesterona acima de 20 ng/mL no D14 (Figura 5).
13 Inicialmente foi observada uma diminuição nas concentrações de progesterona no D9,
14 devido à remoção dos DIVs no D6,5. No D14 foram observadas concentrações
15 superiores em comparação a D6,5 e D9, resultante da síntese luteal (Figura 5).

16

17 **DISCUSSÃO**

18 Os principais achados do presente estudo são: a imunocastração com vacina anti-
19 GnRH é eficiente em inibir o crescimento de folículos antrais; a administração de uma
20 dose única de gonadotrofina utilizada em nosso estudo, não é capaz de reverter o efeito
21 inibitório da imunocastração; a administração de oito doses decrescentes de FSH ou
22 duas aplicações de eCG é eficiente em reverter o efeito da vacina anti-GnRH,
23 promovendo a superovulação; a aplicação de uma dose de hCG é capaz de promover a
24 ovulação e a formação de um CL funcional.

1 Os modelos existentes para suprimir o desenvolvimento folicular disponíveis são
2 implantes de agonista de GnRH (PRENDIVILLE et al., 1995) ou a imunocastração anti-
3 GnRH. A imunocastração foi pouco estudada, sendo apenas recentemente descritas as
4 características ovarianas após o seu uso (VIANA et al., 2021). No presente estudo, após
5 a dose de reforço da vacina, os animais tiveram a regressão folicular, contendo folículos
6 de no máximo 4 mm de diâmetro, que não conseguem se desenvolver e iniciar uma
7 onda folicular. Portanto, o modelo foi adequado em promover a supressão do
8 desenvolvimento de folículos a partir de 4 mm.

9 As possibilidades de reversão do modelo de imunocastração são aplicações
10 exógenas de gonadotrofinas como FSH e eCG. A meia-vida do FSH é curta em relação
11 ao eCG, em torno de 6 horas, o que se torna um fator limitante para seu uso em uma
12 única aplicação (SALES et al., 2011). O uso de um veículo de liberação lenta de
13 fármacos (Pluronic F 127 + PVA) (WENZEL et al., 2002) foi testado juntamente com
14 FSH para estimular o incremento da meia vida, e ser comparado com eCG, como
15 descrito no Experimento 1. Essa aplicação única das gonadotrofinas não surtiu efeito na
16 reversão da imunocastração, fazendo com que os animais tratados se mantivessem com
17 folículos de até 5 mm de diâmetro, não havendo progressão. Portanto, acredita-se que o
18 tempo de ação e/ou a dose das gonadotrofinas empregadas no estudo para reverter a
19 imunocastração não foram suficientes. Futuros estudos devem focar na dosagem de
20 FSH diluído em diferentes veículos, utilizando o modelo de imunocastração, para que
21 seja possível identificar veículos que aumentem sua meia-vida.

22 O modelo de supressão do desenvolvimento folicular, por meio do uso de um
23 implante contendo agonista de GnRH por 6 meses, restringe o desenvolvimento do
24 folículo ovariano ao estágio antral inicial (CROWE et al., 2001; D'OCCHIO et al.,
25 2000). Após usar um protocolo padrão de superestimulação com FSH em doses

1 decrescentes, os folículos apresentam um crescimento significativo, sendo que esse
2 crescimento não difere de animais que recebem o mesmo tratamento com FSH e sem o
3 agonista de GnRH. Isto demonstra que animais que são submetidos ao implante
4 possuem folículos antrais em estágio inicial que são responsivos à estimulação aguda
5 por FSH, demonstrando que um “*pool*” destes folículos estão sempre presentes no
6 ovário (D’OCCHIO et al., 2013). Tal análise leva a crer que a deficiência primária em
7 vacas tratadas por um longo período com um agonista GnRH é o resultado da falta de
8 FSH (GONG, J. G. et al., 1995; GONG, Jin G. et al., 1996), que é necessário para
9 recrutar folículos antrais para uma nova onda folicular (ADAMS, 1999; ADAMS et al.,
10 1992).

11 No modelo de supressão do desenvolvimento folicular com o uso da
12 imunocastração através de vacina anti-GnRH, o fenótipo ovariano parece similar ao
13 observado nos estudos com implantes de agonistas. Após a segunda dose (30 dias
14 depois da primeira), verificamos que as vacas possuem folículos antrais em estágio
15 inicial, com diâmetro máximo de 4 mm, o que provavelmente se deve às baixas
16 concentrações plasmáticas de FSH. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a reversão
17 do modelo de imunocastração com um protocolo padrão de aplicações de oito doses
18 decrescentes de FSH, sendo observados múltiplos folículos maiores que 8 mm de
19 diâmetro no final do tratamento.

20 Em nosso estudo, duas doses de eCG foram eficazes em estimular o crescimento
21 dos folículos até diâmetros pré-ovulatórios. Portanto, optou-se por induzir a ovulação
22 com hCG, uma vez que as vacas imunocastradas são deficientes de GnRH e LH. O
23 tratamento com hCG induziu a ovulação de todos os folículos, demonstrando que
24 folículos que atingem o estágio antral em um ambiente suprimido pela vacina anti-
25 GnRH, apresentam desenvolvimento adequado e capacidade ovulatória. Após a

1 ovulação desses folículos, observou-se a formação de estruturas com morfologia
2 compatível com corpos lúteos, entre os dias D9 e D14, ao exame ultrassonográfico. A
3 formação luteal foi confirmada após mensuração das concentrações de progesterona,
4 que foram superiores a 20 ng/mL no D14, indicando a presença de corpos lúteos
5 funcionais. Nosso estudo demonstrou que vacas tratadas com a vacina anti-GnRH
6 fornecem um valioso modelo para estudar aplicações de gonadotrofinas para o
7 crescimento folicular e ovulação, assim como abre caminhos para futuros estudos
8 relacionados à capacidade reprodutiva de animais submetidos a esse modelo.

9 Em um estudo com tratamento por um longo período com um agonista de
10 GnRH, que limitou o crescimento dos folículos até 4 mm, foi observado aumento na
11 contagem de folículos antrais, o que está diretamente associado à recuperação de
12 complexos *cumulus* oócitos após OPU (BATISTA et al., 2016). Em outro estudo, ao
13 utilizar a vacina anti-GnRH, também foi notório o aumento na contagem de folículos
14 antrais em fêmeas doadoras de oócitos com doença cística ovariana crônica, sugerindo
15 que a imunização contra GnRH não compromete o potencial desenvolvimento do oócito
16 e que a mesma pode ser uma alternativa para restaurar a produção de embriões em vacas
17 doadoras afetadas pela doença (VIANA et al., 2021). Portanto, nosso estudo traz novas
18 perspectivas para aplicabilidade prática na OPU, uma vez que a indução do crescimento
19 folicular utilizando gonadotrofinas exógenas poderá auxiliar no controle das ondas
20 foliculares em vacas doadoras de oócitos ou embriões acometidas por cistos foliculares
21 submetidas ao tratamento com vacina anti-GnRH.

22

23 **CONCLUSÃO**

24 Os dados do presente estudo indicam que a imunocastração com vacina anti-
25 GnRH pode ser utilizada como um modelo para o estudo de alternativas para a

1 suplementação exógena de gonadotrofinas, pois impede o crescimento de folículos
2 maiores que 4 mm de diâmetro. Os resultados indicam também que apenas uma
3 aplicação de gonadotrofinas, conforme utilizada em nosso estudo é ineficaz para
4 reverter esse modelo, porém, com múltiplas aplicações de FSH ou eCG é possível
5 reverter a imunocastração. Ainda, conclui-se que folículos de vacas imunocastradas,
6 estimulados com eCG, são responsivos ao hCG possibilitando a ovulação e formação de
7 corpos lúteos funcionais. Experimentos futuros serão realizados para testar diferentes
8 doses e veículos a serem usados no estímulo do crescimento folicular em fêmeas
9 bovinas.

10

11 **AGRADECIMENTOS**

12 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
13 (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
14 (CNPq) (Edital PRONEX 12/2014, 16/2551-0000494-3). O presente trabalho foi
15 realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
16 - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e CNPq (Chamada Universal
17 MCTIC/CNPq: 424308/2018-5).

18

19 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

20 Os autores informam que não há conflitos de interesse. Os autores são os únicos
21 responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

22

23 **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

1 Todos os autores contribuíram igualmente para a realização dos experimentos e
2 redação do artigo. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a
3 versão final.

4

5 **COMITÊ DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

6 Todos os procedimentos em animais utilizados no estudo foram aprovados pelo
7 comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA nº 8160280120).

8

9 **REFERÊNCIAS**

- 10 ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and
11 the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**,
12 94(1), 177–188, 1992. Disponível em: 94(1), 177–188.
13 <<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940177>> Acesso em: 14 julho 2021, doi:
14 10.1530/jrf.0.0940177.
- 15 ADAMS, G. P. et al. Comparative patterns of follicle development and selection in
16 ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, 54, 17–32. 1999.
- 17 BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive
18 performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction**
19 **Science**, 82-83, 479–486, 2004. Disponível em:
20 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025_2004> Acesso em: 12 juho 2021,
21 doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.025 2004.
- 22 BATISTA, E. O. S. et al. Theriogenology Ovarian follicular growth suppression by
23 long-term treatment with a GnRH agonist and impact on small follicle number , oocyte
24 yield , and in vitro embryo production in Zebu beef cows. **Theriogenology**, 2016. v. 85,
25 n. 9, p. 1680–1687. Disponível em:

- 1 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.023>>. Acesso em: 11 julho 2021,
2 doi: /10.1016/j.theriogenology.2016.01.023.
- 3 CICCIOLO, N. H. et al. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition
4 on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. **Journal**
5 **of Animal Science**, 81(12), 3107–3120, 2003. Disponível em:
6 <<https://doi.org/10.2527/2003.81123107x>> Acesso em: 24 julho 2021, doi:
7 10.2527/2003.81123107x
- 8 CROWE, M. A. et al. Follicular growth and serum follicle-stimulating hormone (FSH)
9 responses to recombinant bovine FSH in GnRH-immunized anoestrous heifers. **Animal**
10 **Science**, v. 73, n. 1, p. 115–122, 2001.
- 11 D’OCCHIO, M. J. et al. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal**
12 **Reproduction Science** 60-61, 433–442, 2000. Disponível em:
13 <[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00078-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00078-6)> Acesso em: 12, julho, 2021. doi:
14 10.1016/s0378-4320(00)00078-6.
- 15 D’OCCHIO et al. Acute follicular response to FSH in heifers downregulated long term
16 with a GnRH agonist and with suppressed ovarian follicular growth. **Theriogenology**,
17 2013. v. 80, n. 9, p. 999–1005. Disponível em:
18 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.028>>. Acesso em: 11 junho 2021,
19 doi:10.1016/j.theriogenology.2013.07.028
- 20 FINNERTY, M.; ENRIGHT, W. J.; ROCHE, J. F. Testosterone, LH and FSH episodic
21 secretory patterns in GnRH-immunized bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**,
22 1998. v. 114, n. 1, p. 85–94. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140085>>
23 Acesso em: 12, junho, 2021. doi: 10.1530/jrf.0.1140085.
- 24 FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in

- 1 Cattle1. **Biology of Reproduction**, 2005. Disponível em: <
2 <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.648>> Acesso em 29, julho, 2021. doi:
3 10.1095/biolreprod65.3.648
- 4 GONG, J. G. et al. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing
5 hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in
6 heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, 105(2), 263–270, 1995. Disponível
7 em: <<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1050263>> Acesso em: 14, julho, 2021. doi:
8 10.1530/jrf.0.1050263
- 9 GONG, Jin G. et al. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and
10 luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused
11 with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, 55(1), 68–
12 74 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.68>> Acesso em: 27,
13 julho, 2021. doi: 10.1095/biolreprod55.1.68
- 14 HIRSBRUNNER, G. et al. Immunization against GnRF in adult cattle: A prospective
15 field study. **BMC Veterinary Research**,. v. 13, n. 1, p. 1–6. 2017. Disponível em:
16 <<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1129-x>> Acesso em: 19, julho,2021. doi:
17 10.1186/s12917-017-1129-x
- 18 KRIEGSFELD, L. J. et al. Identification and characterization of a gonadotropin-
19 inhibitory system in the brains of mammals. **Proceedings of the National Academy of**
20 **Sciences of the United States of America**, 103(7), 2410–2415, 2006. Disponível em: <
21 <https://doi.org/10.1073/pnas.0511003103>> Acesso em:19, julho, 2021. doi: 0–2415,
22 2006.
- 23 L.A., L. et al. Addition of FSH, in contrast to eCG, does not increase pregnancy rates in
24 anestrous Nellore (*Bos indicus*) cows treated with fixed-time AI protocol.

- 1 **Reproduction, Fertility and Development**. 22, 170-170, 2010. Disponível em: <
2 <https://doi.org/10.1071/RDv22n1Ab25>> Acesso em: 20, julho,2021. doi:
3 10.1071/RDv22n1Ab25.
- 4 LUCIA, S. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. v.
5 48, p. 137–157, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00033-](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00033-x)
6 [x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00033-x)> Acesso em: 20,julho,2021. doi: 10.1016/s0378-4320(97)00033-x.
- 7 PRENDIVILLE, D. J. et al. Immunization of heifers against gonadotropin-releasing
8 hormone: antibody titers, ovarian function, body growth, and carcass characteristics.
9 **Journal of animal science**, 73(8), 2382–2389, 1995. Disponível em:
10 <<https://doi.org/10.2527/1995.7382382x>>
11 Acesso em: 21, julho, 2021. doi:10.2527/1995.7382382x.
- 12 ROSSA, L. A. F. et al. Efeito do eCG ou benzoato de estradiol associado ao
13 norgestomet na taxa de concepção de vacas de corte submetidas à IATF no pós-parto.
14 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 199.
15 2016.
- 16 SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing
17 hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol
18 in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, 15 mar. 2010. v. 73, n. 5, p.
19 651–658. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>>.
20 Acesso em: 10, maio, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.004.
- 21 SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH
22 were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-
23 anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, 2011. v. 124, n. 1–2, p. 12–
24 18. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.007>>. Acesso em:

1 22, julho, 2021.

2 SIQUEIRA, L. C. et al. Effects of estradiol and progestins on follicular regression
3 before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**,
4 71(4), 614–619, 2009. Disponível em:
5 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.024>> Acesso em: 22, julho, 2021.
6 doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.024

7 SMALL, J. A. et al. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy
8 rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, 71(4), 698–706, 2009.
9 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.045>> Acesso em: 22,
10 julho, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.045

11 STEVENSON, J. S. et al. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced
12 hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf.
13 **Journal of animal science**, 72(3), 690–699, 1994. Disponível em:
14 <<https://doi.org/10.2527/1994.723690x>> Acesso em 22, julho, 2021. doi:
15 10.2527/1994.723690x

16 VIANA, J. H. M. et al. Active immunization against GnRH as an alternative therapeutic
17 approach for the management of *Bos indicus* oocyte donors diagnosed with chronic
18 cystic ovarian disease. **Theriogenology**, 2021. v. 172, p. 133–141. Disponível em:
19 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.014>>. Acesso em: 29, julho, 2021.
20 doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.06.014

21 WENZEL, J. G. W. et al. Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH
22 reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. **Journal of**
23 **controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 85, n. 1–3,
24 p. 51–59, 2002. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00271-7](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00271-7)>

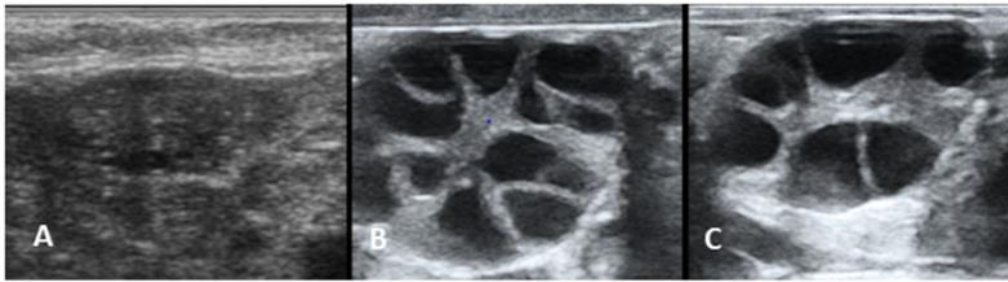
- 1 Acesso em: 29, julho, 2021. doi: 10.1016/s0168-3659(02)00271-7
- 2 YAVAS, Y.; WALTON, J. S. **Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review.**
- 3 **Theriogenology**, 54(1), 25–55, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00323-X)
- 4 [691X\(00\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00323-X)> Acesso em: 22, julho, 2021. doi:10.1016/S0093-691X(00)00323-X.
- 5

Tabela 1 - Diâmetro do maior folículo em vacas imunocastradas tratadas com gonadotrofinas exógenas, conforme os grupos eCG (400UI de eCG); FSH+pluronic (50 mg de FSH (Folltropin) + Pluronic F127); Grupo FSH (50 mg de FSH (Folltropin)).

Identificação do animal	Grupo	Diâmetro do maior folículo (mm)			
		D0	D1	D2	D3
1	eCG	2,6	3	3,3	3
2	eCG	3,5	3,5	5,5	3,7
3	FSH+pluronic	3,7	3,3	4,4	4
4	FSH+pluronic	3	4,4	4	5,4
5	FSH	3,2	4,9	5	4
6	FSH	3,5	5	4	5,7

1

2



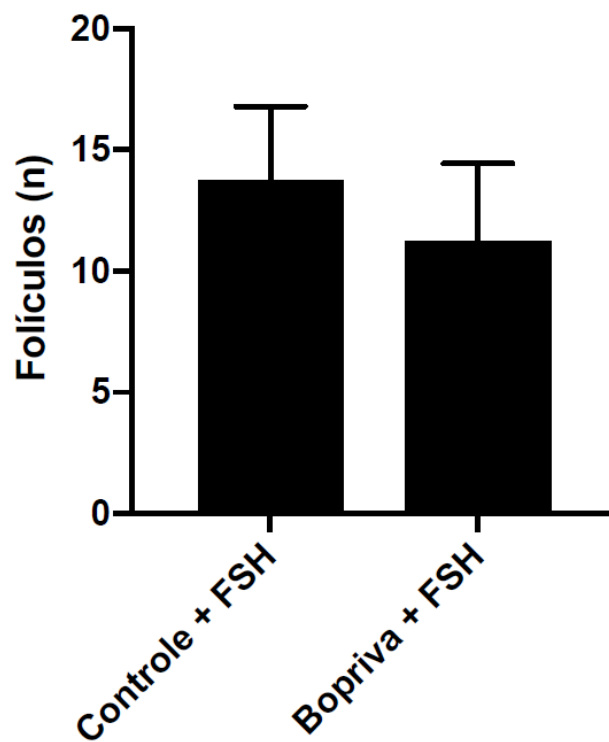
1

2 Figura 1 - Imagens representativas de: A) Ovário de vaca imunocastrada antes do

3 tratamento com FSH; B) Ovário de vaca imunocastrada após 8 aplicações de FSH; C)

4 Ovário de vaca cíclica após 8 aplicações de FSH.

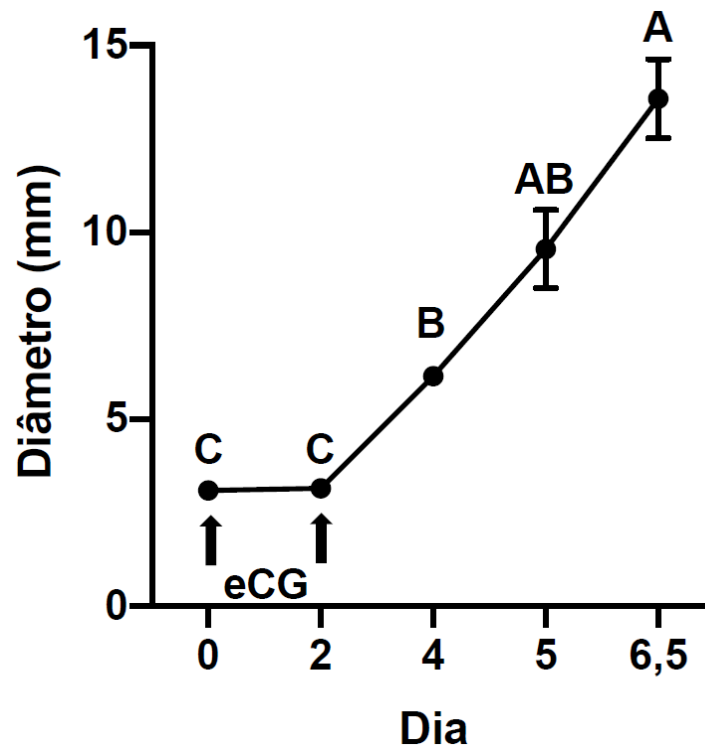
5



1

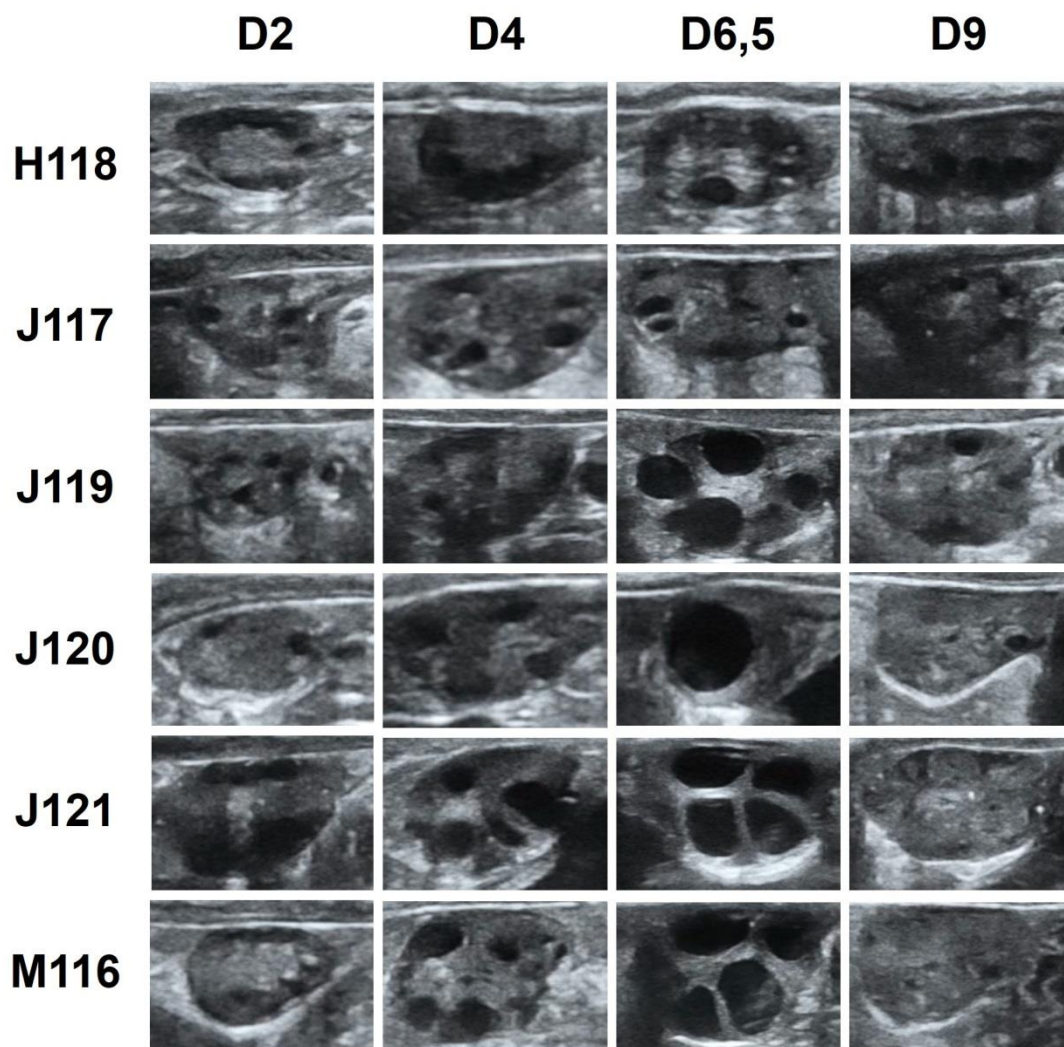
2 Figura 2 - Número médio de folículos por ovário nos grupos controle e Bopriva no D8
3 do experimento, tendo o grupo Bopriva recebido doses decrescentes de FSH totalizando
4 200mg e o grupo controle administrado 500 μ g de cloprostenol sódico e retirados os
5 DIVs.

6



1

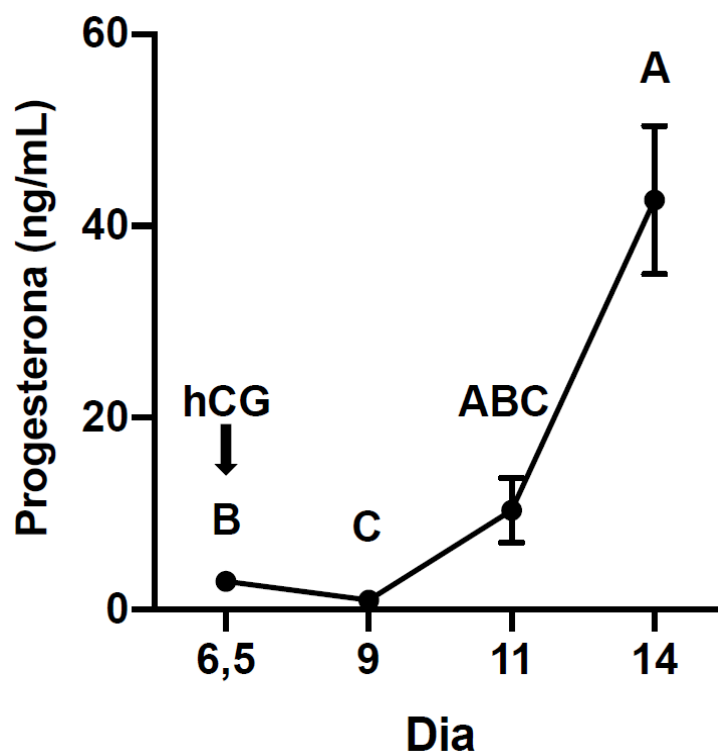
2 Figura 3 - Diâmetro folicular ao longo dos dias após os tratamentos com eCG (830 UI
3 nos D2 e D4). Foram consideradas apenas as vacas responsivas aos tratamentos (n=4).



1

2 Figura 4: Imagens ultrassonográficas de ovários representativas de: D2) Ovários duas
3 semanas após a segunda aplicação de Bopriva e recebendo a primeira aplicação de eCG
4 + implante de P4; D4) Ovários na segunda aplicação de eCG; D6,5) Ovários após as
5 duas aplicações de eCG no momento da retirada do implante de P4 e da aplicação de
6 hCG; D9) Ovários com folículos ovulados após a aplicação de hCG e corpos lúteos em
7 formação, exceto nas vacas H118 e J117, que não responderam aos tratamentos com
8 eCG e não foram tratadas com hCG.

9



1

2 Figura 5: Concentração de progesterona ao longo dos dias após o tratamento com 1250

3 UI de hCG no D6,5. Foram consideradas apenas as vacas responsivas aos tratamentos

4 (n=4).

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a utilização da vacina anti-GnRH é um modelo valioso para estudar suplementação exógena de gonadotrofinas, conseguindo a reversão folicular através da aplicação de FSH e eCG e também demonstra a capacidade ovulatória dos folículos e viabilidade do corpo lúteo. Futuros estudos serão realizados para testar diferentes doses e veículos a serem usados no estímulo do crescimento folicular em fêmeas bovinas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1992.
- AL, M. E. T. ELEVATION OF SERUM TESTOSTERONE DURING CHRONIC LHRH AGONIST TREATMENT IN THE BULL 1 ' 2. 1986. p. 199–207.
- ANALOGS, G. Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Design . Agonists and Antagonists : Rationale and Perspective. 1986. v. 7, n. 1, p. 44–66.
- ATTWOOD, D.; COLLETT, J. H.; TAIT, C. J. The micellar properties of the poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution. **International Journal of Pharmaceutics**, 1985.
- BAKER, A. A. OVUM TRANSFER IN THE COW. **Australian Veterinary Journal**, 1973.
- BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. [S.l.]: [s.n.], 2004.
- BARUSELLI, P S et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2004.
- BHARDWAJ, R.; BLANCHARD, J. Controlled-release delivery system for the α -MSH analog Melanotan-I using poloxamer 407. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1996.
- BINELLI, M. et al. **BASES FISIOLÓGICAS, FARMACOLÓGICAS E ENDÓCRINAS DOS TRATAMENTOS DE SINCRONIZAÇÃO DO CRESCIMENTO FOLICULAR E DA OVULAÇÃO. Acta Scientiae Veterinariae.** [S.l.]: [s.n.], 2006. Disponível em: <<http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/ReproducaoAnimal/dode.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2019.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, 2003.
- CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, 2003.
- CHEN, W. J. et al. Use of fluorescence labeled mesenchymal stem cells in pluronic F127 and porous hydroxyapatite as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. **Journal of Orthopaedic Research**, 2009.
- CICCIOLI, N. H. et al. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, 2003.
- COLE, H. H. et al. Biological half-life of endogenous PMS following hysterectomy and

studies on losses in urine and milk. **Endocrinology**, 1967.

D'OCCHIO, M. J. et al. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. [S.l.]: [s.n.], 2000.

_____ et al. Acute follicular response to FSH in heifers downregulated long term with a GnRH agonist and with suppressed ovarian follicular growth. **Theriogenology**, 2013. v. 80, n. 9, p. 999–1005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.028>>.

DAMM, J. B. L. et al. Structure determination of the major N- and O-linked carbohydrate chains of the β subunit from equine chorionic gonadotropin. **European Journal of Biochemistry**, 1990.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, 2001.

DUFAU, M. L. THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR. **Annual Review of Physiology**, 1998.

FINNERTY, M.; ENRIGHT, W. J.; ROCHE, J. F. Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1998. v. 114, n. 1, p. 85–94.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**, 2005.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. [S.l.]: [s.n.], 2004.

FOWLER, E. B. et al. Evaluation of Pluronic Polyols as Carriers for Grafting Materials: Study in Rat Calvaria Defects. **Journal of Periodontology**, 2005.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, 1999.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, 15 out. 2003. v. 78, n. 3–4, p. 239–257. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003000939?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 maio 2019.

GNANOU, Y.; FONTANILLE, M. **Organic and Physical Chemistry of Polymers**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

GONG, J. G. et al. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1995.

HAZUM, E. L. I.; CONNF, P. M. Molecular Mechanism of Gonadotropin Releasing

- Hormone (GnRH) Action. I. The GnRH Receptor*. 1988. v. 9, n. 4, p. 379–386.
- HIRSBRUNNER, G. *et al.* Immunization against GnRF in adult cattle: A prospective field study. **BMC Veterinary Research**, 2017. v. 13, n. 1, p. 1–6.
- HUANG, J. *et al.* Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. **Chang Gung medical journal**, 2006.
- JOHNSTON, Thomas P.; PUNJABI, M. A.; FROELICH, C. J. Sustained Delivery of Interleukin-2 from a Poloxamer 407 Gel Matrix Following Intraperitoneal Injection in Mice. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, 1992.
- KARSCH, F. J. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. **Biology of reproduction**, 1997.
- KATAKAM, M.; BELL, L. N.; BANGA, A. K. Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1995.
- KRIEGSFELD, L. J. *et al.* Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006.
- L.A., L. *et al.* **Addition of FSH, in contrast to eCG, does not increase pregnancy rates in anestrus Nellore (Bos indicus) cows treated with fixed-time AI protocol. Reproduction, Fertility and Development.**
- LAMB, G. C. *et al.* **Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. Journal of animal science.**
- MARTI, S. *et al.* Effect of anti-gonadotropin-releasing factor vaccine and band castration on indicators of welfare in beef cattle 1 , 2. 2015. p. 1581–1591.
- MARTÍNEZ, M. F. *et al.* Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 2007.
- MARTINUK, S. D. *et al.* Effects of Carbohydrates on the Pharmacokinetics and Biological Activity of Equine Chorionic Gonadotropin in Vivo1. **Biology of Reproduction**, 1991.
- MENEGHETTI, M. *et al.* Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, 2009.
- MENZER, C.; SCHAMS, D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. **Journal of reproduction and fertility**, 1979.
- MORISHITA, M. *et al.* Pluronic® F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**,

2001.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, 1991.

OCCHIO, M J D et al. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. 2000. p. 433–442.

OCCHIO, Michael J D et al. Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. 2002. v. 74, p. 151–162.

ASPDEN, William J; WHYTE, Tim R. Controlled , Reversible Suppression of Estrous Cycles in Beef Heifers and Cows Using Agonists of Gonadotropin-Releasing Hormone 1. 1993. p. 218–225.

OKAYA, T.; SUZUKI, A.; KIKUCHI, K. Importance of grafting in the emulsion polymerization of MMA using PVA as a protective colloid. Effect of initiators. [S.l.]: [s.n.], 1999.

PARADOSSI, G. et al. Poly (vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. 2003. v. 4, p. 687–691.

PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, 2007.

PIERCE , J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 50, p. 465-495, 1981;

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, 1992.

ROSS, P. J. et al. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, 2004.

ROSSA, L. A. F. et al. Efeito do eCG ou benzoato de estradiol associado ao norgestomet na taxa de concepção de vacas de corte submetidas à IATF no pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2016. v. 46, n. 3, p. 199.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, 15 mar. 2010. v. 73, n. 5, p. 651–658. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X09005093?via%3Di> hub>. Acesso em: 10 maio 2019.

SÁ FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, 2011.

SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, 2011. v. 124, n. 1–2, p. 12–18. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.007>>.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of reproduction**, 2001.

SIQUEIRA, L. C. et al. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, 2009.

SMALL, J. A. et al. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, 2009.

STEVENSON, J. S. et al. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **Journal of animal science**, 1994.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1981.

SUNDERLAND, S. et al. Selection , dominance and atresia of follicles during the of heifers cycle. 1993. n. i.

THEDY, D. X. et al. Influence of Follicular Growth Stimulation on Fertility of Beef Cows Treated with eCG or FSH in FTAI Protocols. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2018. v. 46, n. 1, p. 1–6.

VIANA, J. H. M. *et al.* Active immunization against GnRH as an alternative therapeutic approach for the management of *Bos indicus* oocyte donors diagnosed with chronic cystic ovarian disease. **Theriogenology**, 2021. v. 172, p. 133–141. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.014>>.

WANG, P. L.; JOHNSTON, T P. Enhanced stability of two model proteins in an agitated solution environment using poloxamer 407. **J Parenter Sci Technol**, 1993.

WENZEL, J. G. W. et al. Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, 2002. v. 85, n. 1–3, p. 51–59.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. **Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. Theriogenology.**