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

Tese

Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas

Fabiane Pereira de Moraes

Pelotas, 2023

Fabiane Pereira de Moraes

Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas

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

Orientador: Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M827r Moraes, Fabiane Pereira de

Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas / Fabiane Pereira de Moraes ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2023.

79 f. : il.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Controle do ciclo estral. 2. Fatores locais. 3. Superfamília tgf-β. 4. Gonadotrofina coriônica humana. 5. Luteotrófico. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.20824

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Fabiane Pereira de Moraes

Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas

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

Data da Defesa: 17/01/2023

Banca examinadora:

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

Drª Daniele Missio
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Drª Juliana Germano Ferst
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Drª Monique Tomazele Rovani
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Mari

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e me fortalecer durante a caminhada. Obrigada por tanto!

Ao meu anjinho Miguel, meu amor. Obrigada por ter me ensinado tanto sobre amor e força com a tua curta passagem por aqui. Te amo além desta vida!

Aos meus pais, José Miguel e Marilena, por toda torcida, educação e pela vida! Meus exemplos de trabalho, luta e honestidade!

À minha irmã, Josiane, obrigada por sempre acreditar em mim, desde os tempos do vestibular e por me estender a mão sempre!

Ao meu namorado, Mozer, por todo apoio, cuidado e amor. Por aturar meus surtos, assistir meus ensaios para as apresentações e estar sempre disposto a ajudar!

Aos meus orientadores, Bernardo e Arnaldo, por todos os ensinamentos, direção, exemplo, por estarem sempre dispostos a de fato orientar e criar oportunidades de aprendizado. Obrigada por tudo!

Aos professores, Rafael e Thomaz, por todo conhecimento transmitido, parceria em experimentos, aulas e horas do café!

A todos os colaboradores do grupo FIBRA, em especial a Jéssica e ao Gabriel, por toda ajuda e amizade! Formamos um bom trio de trabalho e “deboches”.

À EMBRAPA e ao Centro Agropecuário da Palma pela disponibilidade dos animais para realização dos experimentos que fazem parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código de Financiamento 001) pela bolsa de doutorado e aos órgãos de fomento, CNPq e FAPERGS, sem os quais não seria possível fazer pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária (PPGV-UFPel), a Faculdade de Veterinária (FaVet-UFPel) e a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de aprender um pouco mais!

E por fim, mas muito importante, obrigada aos seres que despertaram em mim o amor pela Medicina Veterinária: aos animais, meu respeito, dedicação e afeto!

Resumo

MORAES, Fabiane Pereira de. **Regulação da foliculogênese antral, ovulação e luteinização em fêmeas bovinas.** 2023. 79f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

O conhecimento sobre o controle endócrino e local da foliculogênese, ovulação e luteinização é crucial para o entendimento de processos fisiológicos e patológicos, para o aprimoramento do controle do ciclo estral e desenvolvimento de tecnologias que visem o aumento da taxa ovulatória, ou contracepção, em diferentes espécies. Neste contexto, o objetivo desta tese foi avançar no entendimento do controle local da função ovariana e investigar uma alternativa para aprimorar o controle da ovulação e função luteal em bovinos. O primeiro estudo, revisou e discutiu os principais avanços na compreensão dos fatores locais envolvidos na foliculogênese e ovulação, com ênfase aos membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF-β), proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9). No segundo estudo, avaliou-se o efeito de duas administrações, por via intramuscular, do anti-inflamatório não esteroidal (AINE) flunixina meglumina (FM) sobre a ovulação, induzida pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A administração parenteral do AINE FM (1.1 mg/kg) 16h e 26h após a indução da ovulação com GnRH não afetou a ocorrência do processo ovulatório. Em um terceiro estudo, buscou-se determinar a curva de concentração sérica de β-hCG ao longo do tempo 0 h (D0), 24 h (D1), 96 h (D4) e 168 h (D7) após a aplicação de 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por via intramuscular; avaliar o efeito de 1000 UI de hCG, combinado ou não ao GnRH, sobre a função luteal (produção de P4), perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência do CL; mensurar o efeito de 1000 UI de hCG sobre a concentrações intrafoliculares de estradiol (E2) e P4, 24h após a indução da ovulação. Foi demonstrado um pico de concentração de β-hCG 24h após a aplicação da hCG, que retornou sete dias depois às concentrações da hora zero (momento da aplicação). A associação de dois indutores de ovulação (GnRH + hCG) melhorou a capacidade esteroidogênica do CL, sem alterar as suas características estruturais (perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência). Quando utilizada somente a hCG (1000 UI) foi observado um incremento no tamanho do CL (diâmetro, área e circunferência), sem afetar a concentração de progesterona e perfusão sanguínea. Além disso, não houve diferença nas concentrações intrafoliculares de E2 e P4, 24h após indução da ovulação, entre vacas do grupo GnRH e hCG. Com base nos estudos descritos, os fatores oocitários (BMP15 e GDF9) são essenciais na regulação da diferenciação folicular, determinação da taxa ovulatória e ocorrência da ovulação. A administração de duas doses de FM, em dose terapêutica, na fase final do processo ovulatório não bloqueou a ovulação e, portanto, não representa um modelo apropriado para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório. Ainda, a administração de 1000 UI de

hCG como indutor de ovulação ocasionou resultados pouco expressivos sobre a função luteal de vacas cíclicas, entretanto, novas pesquisas devem investigar a sua utilização em vacas com deficiência de LH.

Palavras-chave: controle do ciclo estral; fatores locais; superfamília TGF-β; gonadotrofina coriônica humana; luteotrófico.

Abstract

MORAES, Fabiane Pereira de. **Regulation of antral folliculogenesis, ovulation and luteinization in bovine females.** 2023. 79f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

The knowledge about the endocrine and local control of folliculogenesis, ovulation and luteinization is crucial for understanding physiological and pathological processes, for improving control of the estrous cycle and developing technologies aimed at increasing the ovulatory rate, or contraception, in distinct species. In this context, the objective of this thesis was to advance the understanding of the local control of ovarian function and to investigate an alternative to improve ovulation control and luteal function in cattle. The first study reviewed and discussed the main advances in understanding the local factors involved in folliculogenesis and ovulation, with emphasis on members of the superfamily of transforming growth factors beta (TGF-β), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth and differentiation factor 9 (GDF9). In the second study, the effect of two intramuscular administrations of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) flunixin meglumine (FM) on ovulation, induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) was assessed. Parenteral administration of FM (1.1 mg/kg) performed 16h and 26h after ovulation induction with GnRH did not affect ovulation. In a third study, we sought to determine the curve of serum β-hCG concentration over time 0 h (D0), 24 h (D1), 96 h (D4) and 168 h (D7) after administration of 1000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) intramuscularly; to evaluate the effect of 1000 IU of hCG, combined or not with GnRH, on luteal function (P4 production), blood perfusion, CL diameter, area and circumference; and to measure the effect of 1000 IU of hCG on intrafollicular concentrations of estradiol (E2) and P4 24h after ovulation induction. A peak of β-hCG concentration was demonstrated 24 hours after hCG administration, which seven days later returned to levels similar to 0 h. The association of two ovulation inducers (GnRH + hCG) improved the steroidogenic capacity of CL, without altering its structural characteristics (blood perfusion, diameter, area and circumference). When only hCG (1000 IU) was used, an increase in CL size (diameter, area and circumference) was observed, without affecting the concentration of progesterone and blood perfusion. Furthermore, there was no difference in intrafollicular concentrations of E2 and P4, 24h after ovulation induction, between cows in the GnRH and hCG groups. Based on the studies described, oocyte factors (BMP15 and GDF9) are essential in the regulation of follicular differentiation, determination of ovulatory rate and ovulation occurrence. The administration of two doses of FM, in a therapeutic dose, in the final phase of the ovulatory process did not block ovulation and, therefore, does not represent an appropriate model for the study of prostaglandins in the ovulatory process. The administration of 1000 IU of hCG as an ovulation inducer caused mild changes in the

luteal function and structure of cyclic cows; however, future research should investigate its use in cows with LH deficiency.

Keywords: control of the estrous cycle; local factors; TGF-β superfamily; human chorionic gonadotropin; luteotrophic.

Lista de Figuras

Artigo 1 **Local regulation of antral follicle development and ovulation in monovulatory species**

Figura 1 Representative images (PAS staining) of dominant, subordinate and preovulatory follicles used to characterize gene expression..... 40

Figura 2 Summary of results from studies performed by our group investigating the local control of dominant follicle selection in cows..... 41

Figura 3 Summary of results from studies performed by our group investigating the local control of ovulation in cows..... 42

Figura 4 Corpus luteum with 23.2 mm 12 days after IFI with PBS (A). Luteal cyst with 31.6 mm 12 days after IFI with BMP15 (B)…… 43

Artigo 3 **Ação da hCG sobre a função luteal e características do corpo lúteo em vacas**

Figura 1 Concentração sérica de β-hCG (mUI/mL) 0 h (dia 0), 24 h (dia 1), 96 h (dia 4) e 168 h (dia 7) após a aplicação de 1000 UI de hCG por via intramuscular..... 64

Figura 2 Concentração de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 5 e 7 após a aplicação dos tratamentos nos seguintes grupos: GnRH (n=5) e GnRH + hCG(n=5) 65

Figura 3 Diâmetro (A), área (B), circunferência (C) do corpo lúteo (CL) (mm) e concentração de progesterona sérica (D) nos dias 5 e 12 após os tratamentos nos seguintes grupos: GnRH (n=9) e hCG (n=9)..... 66

Figura 4 Concentração intrafolicular de estradiol (A) e progesterona (B) 24 h após a administração dos tratamentos nos seguintes grupos: GnRH (n=3) e hCG (n=6) 67

Lista de Tabelas

Artigo 2 **A administração parenteral de flunixina meglumina em dose terapêutica não bloqueia a ovulação em fêmeas bovinas**

Tabela 1 Diâmetro folicular e ocorrência de ovulação em vacas tratadas ou não com 1,1 mg/Kg AINE FM às 16 h e 26 h após indução da ovulação com GnRH 53

Lista de Abreviaturas e Siglas

ActR	Receptor da ativina
ADIPOR1	Receptor 1 de adiponectina
ADIPOR2	Receptor 2 de adiponectina
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
AMH	Hormônio anti-mulleriano
AMHR	Receptor do hormônio anti-mulleriano
BE	Benzoato de estradiol
CE	Cipionato de estradiol
β-hCG	Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana
BMP2	Proteína morfogenética óssea 2
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
BMPR	Receptor da proteína morfogenética óssea
BMPR1A	Receptor da proteína morfogenética óssea tipo 1A
BMPR1B	Receptor da proteína morfogenética óssea tipo 1B
CCND2	Ciclina D2
CG	Células da granulosa
CL	Corpo lúteo
CYP11A1	*Cholesterol side-chain cleavage*
CYP19A1	Aromatase
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ESR1	Receptor 1 de estrógeno
ESR2	Receptor 2 de estrógeno
FD	Folículo dominante

FGF10	Fator de crescimento de fibroblastos 10
FM	Flunixina meglumina
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHR	Receptor do hormônio folículo estimulante
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
i.m	Intramuscular
INHA	Subunidade alfa da inibina
INHBA	Subunidade beta A da inibina
INHBB	Subunidade beta B da inibina
LEPROT	*Leptin receptor overlapping transcript*
LH	Hormônio luteinizante
LHCGR	Receptor do hormônio luteinizante
MB	Membrana basal
µg	Micrograma
ng	Nanograma
NPPC	Peptídeo natriurético C
NPR1	Receptor do peptídeo natriurético 1
NPR2	Receptor do peptídeo natriurético 2
NPR3	Receptor do peptídeo natriurético 3
OSMR	Receptor M de oncostatina
P4	Progesterona
PGF	Prostaglandina F2 alfa
PGE	Prostaglandina E2
PPARG	Receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama
PTGFR	Receptor da prostaglandina F2 alfa
PTGS1	Prostaglandina endoperóxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina endoperóxido sintase 2
StAR	*Steroidogenic acute regulatory protein*
TGF-β	Família dos fatores de crescimento transformantes beta
TGFBR1	Receptor 1 do fator de crescimento transformante beta

Sumário

1 Introdução..... 15
1.1 Objetivos..... 19
1.1.1 Objetivo geral..... 19
1.1.1.1 Objetivos específicos..... 19
2 Artigos..... 20
2.1 Artigo 1: Local regulation of antral follicle development and ovulation in monovulatory species..... 20
2.2 Artigo 2: A administração parenteral de flunixina meglumina em dose terapêutica não bloqueia a ovulação em fêmeas bovinas..... 44
2.3 Artigo 3: Ação da hCG sobre a função luteal e características do corpo lúteo em vacas..... 54
3 Considerações Finais..... 68
Referências..... 69
Anexos..... 78

1 Introdução

O conhecimento sobre a fisiologia do ciclo estral, incluindo o controle endócrino da foliculogênese, ovulação e formação do corpo lúteo (CL) permitiram a descoberta de novas abordagens e o avanço nas técnicas de controle do ciclo estral, otimizando o uso de biotécnicas da reprodução. Porém, diversos aspectos relacionados à seleção do folículo dominante, cascata ovulatória, formação e manutenção do CL ainda não estão completamente elucidados.

O ciclo estral da fêmea bovina apresenta de duas a três ondas de crescimento folicular, as quais ocorrem a partir da elevação das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH). No início de uma nova onda ocorre o recrutamento de um grupo de pequenos folículos antrais, que terão uma fase de desenvolvimento em comum. O aumento das concentrações de estradiol e inibina é responsável por fazer *feedback* negativo para a síntese e liberação de FSH, desta forma, somente o folículo que for capaz de continuar o seu crescimento nessas condições endócrinas será selecionado e denominado folículo dominante (FD). Esse momento é definido como divergência folicular, que ocorre quando o maior folículo apresenta por volta de 8,5 mm e 6 mm, em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*, respectivamente. O FD se torna dependente do hormônio luteinizante (LH), expressando receptores de LH nas células da granulosa (LHCGR) e continuará seu desenvolvimento até encontrar um ambiente endócrino adequado para que ocorra a ovulação, com baixa concentração de progesterona e alta concentração de estradiol, estimulando a síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente de LH. Caso essas condições não sejam atendidas, este folículo entrará em atresia (GINTHER et al., 1996; GINTHER et al., 2003; GIMENES et al., 2008).

A seleção de um dos folículos de cada onda é estabelecida a partir da regulação local da fisiologia ovariana, ou seja, a partir de fatores produzidos no ovário e que atuam determinando o destino de cada folículo, assim como atuando em diferentes funções ovarianas. Muitos fatores produzidos localmente são responsáveis pela regulação da foliculogênese antral e ovulação, entre eles estão os membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF-β) que incluem

proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), hormônio anti-mulleriano (AMH), ativinas e inibinas (revisado por JUENGEL et al., 2018). Entre os fatores produzidos localmente no ovário, BMP15, GDF9 e AMH são os mais estudados. Em ovelhas, mutações nos genes BMP15 e GDF9, em heterozigose promovem o aumento da taxa de ovulação, enquanto ovelhas homozigotas para mutações em GDF9 ou BMP15 falham em produzir quantidades suficientes de proteína biologicamente ativa para estimular a proliferação das células da granulosa, portanto, o crescimento folicular normal é impedido e esses animais são inférteis (JUENGEL et al., 2013). Já ovelhas com mutação no gene BMPR1B (receptor de BMP15) apresentam fenótipo de hiperprolificidade ainda maior em homozigose (Booroola) (FABRE et al., 2003), sugerindo que a modulação dessa via tem o potencial de fundamentar novos protocolos de superovulação.

Em bovinos, um estudo do nosso grupo demonstrou que a injeção intrafolicular de BMP15 inibiu o crescimento do FD e a ovulação induzida por GnRH, porém, não afetou a luteinização e produção de progesterona (HAAS et al., 2022). Esses dados sugerem que a BMP15 possui um efeito inibitório no crescimento e diferenciação folicular, o que é corroborado por outro estudo recente que demonstrou que vacas portadoras de mutação (alelo TRIO) relacionada à alta taxa ovulatória apresentam maior expressão de RNAm de SMAD6 nas células da granulosa. A SMAD6 é um fator inibitório da via de sinalização da BMP15, o que reforça a hipótese de que a sinalização da BMP15 deve diminuir para que os folículos adquiram a capacidade ovulatória (GARCIA-GUERRA et al., 2018; KAMALLUDIN et al., 2018). Embora avanços significativos tenham sido obtidos na compreensão da regulação local, a manipulação dos fatores envolvidos foi inserida às práticas de controle do ciclo estral apenas em ovinos.

Na rotina do controle reprodutivo de bovinos, é comumente utilizada a manipulação endócrina do ciclo estral, a partir da administração de hormônios exógenos, tais como: progesterona (P4), ésteres de estradiol, prostaglandina F2 alfa (PGF) e GnRH. Esses protocolos hormonais visam sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, a partir da supressão de gonadotrofinas, FSH e LH, no caso de protocolos baseados em estrógeno e progesterona. Em protocolos baseados no uso do GnRH, tem-se como objetivo induzir a ovulação de um FD e o início de uma nova onda imediatamente após. Além disso, nesses protocolos são utilizados como agente luteolítico a PGF e indutores de ovulação.

Além da ação luteolítica, as prostaglandinas, em especial a PGF e a prostaglandina E2 (PGE) são essenciais na cascata ovulatória, sendo demonstrado por vários estudos que a inibição das enzimas prostaglandina endoperóxido sintase 1 e 2 (PTGES 1 e PTGS2), a partir do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), inibiu a ovulação em bovinos, ovinos e equinos (MURDOCH e DUNN, 1983; DE SILVA e REEVES, 1985; CUERVO-ARANGO e DOMINGO-ORTIZ, 2011; VERNUNFT et al., 2022). Além disso, o tratamento com AINE no momento da IA reduziu a taxa de prenhez em cabras (FONSECA et al., 2017). A PGF foi capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em novilhas pré-puberes, vacas de corte lactantes e vacas leiteiras (LEONARDI et al., 2012; PFEIFER et al., 2014; CASTRO et al., 2018; PFEIFER et al., 2018) e com taxas de prenhez semelhantes às obtidas com uso de ésteres de estradiol, como indutores de ovulação. Porém, em nossos estudos, quando utilizada por via intrafolicular, a PGF não antecipou o momento da ovulação. Quanto administrada pela via intramuscular, 23 h após a indução da ovulação com GnRH, a PGF reduziu a vascularização folicular, não sendo capaz de promover a ovulação de forma isolada (PEREIRA DE MORAES et al., 2021). Com base nesses resultados e através do conhecimento de que a PGE possui concentrações mais elevadas próximo ao momento da ovulação do que a PGF (BERISHA et al., 2019), o estabelecimento de um modelo de inibição da ovulação a partir do uso de AINEs poderia auxiliar na melhor compreensão da atuação da PGE e da interação entre PGE e PGF no processo ovulatório de bovinos, podendo contribuir futuramente para o desenvolvimento de novas alternativas de indutores de ovulação.

Os hormônios indutores são essenciais para controlar o momento da ovulação em protocolos hormonais. Atualmente, estão disponíveis comercialmente os ésteres de estradiol como benzoato e cipionato de estradiol (BE e CE, respectivamente), análogos do GnRH e, menos comumente, a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Os ésteres de estradiol possuem uso restrito em muitos países, devido aos possíveis efeitos que seus resíduos possam ocasionar à saúde do consumidor (LANE et al., 2008). Portanto, evidencia-se a relevância da melhor compreensão a respeito do processo ovulatório e da identificação de substâncias que possam induzir a ovulação síncrona e ainda intensificar a capacidade esteroidogênica do CL subsequente.

A hCG pode ser uma alternativa aos indutores de ovulação mais comumente utilizados. Trata-se de um hormônio glicoproteico heterodimérico, ou seja, composto por uma subunidade α e uma subunidade β. A subunidade α é comum a outras

glicoproteínas, como o LH e o FSH, porém a subunidade β difere em comprimento e confere individualidade estrutural, bem como especificidade de atividade fisiológica a cada hormônio. A subunidade β do hCG é 80 a 85% semelhante à estrutura do LH, fornecendo à hCG capacidade de se ligar aos receptores de LH (LHCGR) e exercer uma atividade semelhante a esse hormônio. A principal diferença entre as subunidades β de hCG e LH reside na sequência de extensão do peptídeo carboxi-terminal (CTP) de 24 aminoácidos, que confere a hCG uma meia-vida mais longa (revisado por RENSIS et al., 2010; SMITZ & PLATTEAU, 2020; CUNHA & MARTINS, 2022). Apesar de seu efeito potente e mais prolongado como indutor de ovulação, na espécie bovina a hCG é pouco utilizada na rotina devido ao alto custo atribuído ao seu tratamento, além de que as doses utilizadas nos estudos variam amplamente, assim como os resultados obtidos.

O efeito luteotrófico da hCG proporciona aumento no tamanho das células lúteas e maior proporção de células lúteas grandes em relação às células lúteas pequenas (FARIN et al., 1988; SCHMITT et al., 1996). Portanto, a hCG poderia ser uma alternativa promissora para vacas deficientes em gonadotrofinas, como é o caso de vacas em anestro, atuando como suporte de LH. DE RENSIS et al. (2008) observaram maiores concentrações de progesterona nos dias 3, 6 e 9 após IATF, em vacas que receberam como indutor de ovulação a hCG (3300 UI), quando comparado ao grupo GnRH. No mesmo estudo, foi demonstrada maior taxa de prenhez cumulativa (após duas IATFs) durante a estação quente em vacas tratadas com hCG. O tratamento com hCG (3000 UI) melhorou as taxas de ovulação ao longo do ano em vacas leiteiras em anestro, e as taxas de prenhez em vacas leiteiras em anestro sob condições de estresse térmico, em comparação ao tratamento com GnRH (GARCIA-ISPIERTO et al., 2019). A administração de GnRH requer a presença de LH na hipófise para ser eficaz e o efeito endógeno do LH possui menor duração do que a hCG. Portanto, o uso de hCG em substituição ao GnRH pode beneficiar vacas com baixo escore de condição corporal, em anestro pós-parto e vacas leiteiras de alta produção em condições de estresse térmico. Ainda, em vacas cíclicas é possível que o seu efeito luteotrófico possa trazer benefícios e potencializar a função luteal, refletindo em maior concentração de progesterona e melhor desempenho em programas de IATF e TETF.

É importante ressaltar que a hCG nas doses referidas (3000 UI) agrega um custo mais do que dez vezes superior a utilização de GnRH, o que inviabiliza a o uso em larga escala em protocolos hormonais. Portanto, a investigação de uma dose mais viável do ponto de vista econômico e obtenção de informações consistentes sobre sua ação na função luteal, características do CL e concentração sérica (β-hCG) ao longo do tempo são fundamentais para determinar a sua aplicabilidade.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avançar no entendimento do controle local da função ovariana e investigar uma alternativa para aprimorar o controle da ovulação e função luteal em bovinos.

1.1.1.1 Objetivos específicos

1) Discutir os principais avanços na compreensão dos fatores locais envolvidos na foliculogênese e na ovulação, com foco em dados obtidos por nosso grupo utilizando modelos *in vivo* em bovinos;

2) Avaliar o efeito de duas administrações, por via intramuscular, do anti-inflamatório não esteroidal (AINE) flunixina meglumina (FM) sobre a ovulação induzida por GnRH;

3) Determinar a curva de concentração sérica de β-hCG ao longo do tempo (0 h (D0), 24 h (D1), 96 h (D4) e 168 h (D7) após a aplicação de 1000 UI do hormônio por via intramuscular;

4) Avaliar o efeito de 1000 UI de hCG, combinado ou não ao GnRH, sobre a função luteal (produção de progesterona), perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência do corpo lúteo;

5) Mensurar o efeito de 1000 UI de hCG sobre as concentrações intrafoliculares dos hormônios esteroides, estradiol e progesterona durante a luteinização (24h após a indução da ovulação).

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Local regulation of antral follicle development and ovulation in monovulatory species

Fabiane Pereira de Moraes, Daniele Missio, Jessica Lazzari, Monique Tomazele Rovani, Rogério Ferreira, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Bernardo Garziera Gasperin

Publicado na revista Animal Reproduction

Review Article

Running title: Local control of antral folliculogenesis

Local regulation of antral follicle development and ovulation in monovulatory species

Fabiane Pereira de Moraes[1, 2] (0000-0003-2502-4108), Daniele Missio[2] (0000-0003-3524-1894), Jessica Lazzari[1, 2] (0000-0003-1832-4575), Monique Tomazele Rovani[2] (0000-0001-8257-3635), Rogério Ferreira[3] (0000-0003-1349-7821), Paulo Bayard Dias Gonçalves[2] (0000-0002-0671-1466), Bernardo Garziera Gasperin[1, 2] (0000-0002-3715-2345) *

[1] Federal University of Pelotas, Department of Animal Pathology, Capão do Leão, RS, Brazil

[2] Rio Grande do Sul Innovative Networks of Strategic Technologies Program (RITEs-RS), RS, Brazil.

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

*Correspondence: Bernardo Garziera Gasperin, bernardo.gasperin@ufpel.edu.br, Graduate Program in Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil.

Abstract

The identification of mutations in the genes encoding bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth and differentiation factor 9 (GDF9) associated with phenotypes of sterility or increased ovulation rate in sheep aroused interest in the study of the role of local factors in preantral and antral folliculogenesis in different species. An additive mutation in the BMP15 receptor, BMPR1b, which determines an increase in the ovulatory rate, has been introduced in several sheep breeds to increase the number of lambs born. Although these mutations indicate extremely relevant functions of these factors, the literature data on the regulation of the expression and function of these proteins and their receptors are very controversial, possibly due to differences in experimental models. The present review discusses the published data and

preliminary results obtained by our group on the participation of local factors in the selection of the dominant follicle, ovulation, and follicular atresia in cattle, focusing on transforming growth factors beta and their receptors. The study of the expression pattern and the functionality of proteins produced by follicular cells and their receptors will allow increasing the knowledge about this local system, known to be involved in ovarian physiopathology and with the potential to promote contraception or increase the ovulation rate in mammals.

Keywords: oocyte; deviation; transforming growth factors.

Introduction

Besides the classical endocrine regulation of ovarian events, a complex local regulation of selection, follicular differentiation and ovulation processes has been revealed in recent decades. Characterization studies have revealed the regulation of the expression of genes encoding proteins and receptors during antral follicle development and ovulation. The deviation model allows to compare different features of the follicular environment in follicles before, during and after dominant follicle selection, while the ovulation model allows to investigate the acute changes induced between GnRH treatment and follicular rupture (Figure 1). A summary of the findings from our group regarding local factors during dominant follicle selection and ovulation is presented in Figure 2 and 3, respectively. Furthermore, through studies using the intrafollicular injection model, combined with studies involving immunization against proteins of interest, the functions of factors produced locally in the ovary have been revealed.

To date, scientific studies have shown that advances in understanding the local regulation will potentially lead to the discovery of new approaches to reverse reproductive disorders, predict the outcome of assisted reproduction techniques, increase the number of oocytes and/or embryos for superior genetic multiplication, obtain greater control of the moment of ovulation in the biotechniques of reproduction, promote contraception to control populations of domestic or wild animals. The present review discusses advances in the understanding of local factors

involved in folliculogenesis and ovulation, focusing on data obtained by our group using in vivo models in bovine species. Further information regarding in vivo bovine models to study ovarian function can be assessed in a review by Rovani et al. (2018).

Transforming growth factors: major players in the local control of antral follicle development

Factors produced in the ovary are considered regulators of the local follicular environment, determining the future of each follicle, and acting in different ovarian functions. The group of bone morphogenetic proteins (BMPs) is composed by about 20 ligands and seven serine/threonine receptor kinases (BMPRs) divided into type I and type II. These proteins, together with growth and differentiation factors (GDFs) and the anti mullerian hormone (AMH), belong to the superfamily of transforming growth factors beta (TGFβ; reviewed by Knight and Glister, 2006). TGFβ proteins initiate signaling by binding to a type II receptor, which in turn phosphorylates the kinase domain of a type I receptor. The phosphorylated type I receptor propagates the signal through the phosphorylation of proteins called SMADs, divided into three classes: regulated by the receptors (R-SMADs), the co-mediator (Co-SMAD) and the inhibitors (I-SMADs; Shi and Massagué, 2003). Activated SMAD complexes carry signaling to the nucleus and interact with nuclear cofactors to regulate transcription of target genes. GDF9, BMP15 (also known as GDF9b) and AMH are the main proteins of the TGFβ superfamily studied in ovarian function.

BMP15 and GDF9 may act separately in a monomeric way binding to type I and type II TGFβ receptors or synergistically, possibly as BMP15:GDF9 heterodimers (Heath et al., 2017). These proteins are expressed at all stages of follicular development in several animal species including bovine (Alam and Miyano, 2020) and have been shown to play central role in fertility (McNatty et al., 2007; Crawford and McNatty, 2012). Thus, interest in understanding the role of these factors in mammalian ovarian and reproductive physiology has increased in recent

decades. In addition, studies demonstrate that the manipulation of TGFs can be applied in techniques to control the estrous cycle in different species such as sheep, cattle, horses, and deer (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Juengel et al., 2009; Davis et al., 2018).

Oocyte-secreted BMP15 and GDF9 often act synergistically with surrounding cumulus, granulosa, and theca cells through paracrine mechanisms (Knight and Glister, 2006; Heath et al., 2017; Alam et al., 2018; Belli and Shimasaki, 2018). The functions attributed to BMP15 and GDF9 include regulation of follicular development, cumulus function, oocyte maturation, steroid production, expression of gonadotropin receptors, and determination of ovulatory rate (Paulini and Melo, 2011; Gasperin et al., 2014; Rossi et al., 2016). Furthermore, there is evidence of the involvement of these proteins in ovulation and luteinization processes (Juengel et al., 2009; Haas et al., 2022).

Functional studies investigating the role of oocyte-secreted proteins have been conducted in mice and ruminants. Infertility was observed in mice when the GDF9 gene was neutralized and follicular development did not progress from the primary follicle stage, in addition to decreasing granulosa cell proliferation (Dong et al., 1996). Mice neutralized for BMP15 also exhibit subfertility (Yan et al., 2001). In sheep, homozygous inactivating mutations in the genes encoding BMP15 (Galloway et al., 2000) and GDF9 (Hanrahan et al., 2004) have been identified as being associated with infertility. In this sense, in cows, immunization of GDF9 alone or in combination with BMP15 reduced follicular development and ovulation rate (Juengel et al., 2009). Therefore, GDF9 and BMP15 exert essential functions during follicular development in both mono- and poly-ovulatory species (Hanrahan et al., 2004; McNatty et al., 2004, 2007).

Besides follicular development, TGFβ superfamily factors act on mammalian ovulation. In sheep, point inactivating mutations in BMP15 and GDF9 (in heterozygosity), and in the BMPR1b (also known as ALK6), are associated with precocious follicular differentiation and

increased ovulation rate (McNatty et al., 2005, 2004; Garcia-Guerra et al., 2018b). Juengel et al. (2009) performed active immunization against GDF9 and BMP15 proteins in cows and obtained superovulation in some animals, suggesting that these factors are involved in the selection of the dominant follicle and determination of the ovulation rate. In sheep, besides the increase in ovulation rate after a short period of immunization against BMP15 or GDF9, no significant effects were observed on oocyte fertilization, embryonic development and on pregnancy maintenance (Juengel et al., 2004). On the other hand, immunization against these proteins for prolonged periods caused a block in follicular development (McNatty et al., 2007). These results are different from those obtained in mares, in which immunization against GDF9 did not affect ovulation rate, but decreased preovulatory follicle diameter and estrus manifestation, while immunization against BMP15 negatively affected ovulatory rate and resulted in luteinization/ovulation of small follicles (Davis et al., 2018).

In cattle, using in vivo models, we have demonstrated that GDF9 concentration in follicular fluid does not differ between healthy and atretic follicles, and that GDF9 intrafollicular injection has no effect on dominant follicle growth (Haas et al., 2016). However, BMP15 intrafollicular injection inhibited dominant follicle growth and ovulation, but not luteinization, inducing the formation of luteinized cysts (Figure 4; Haas et al., 2022). Collectively, these results demonstrate a great potential for the use of BMP15 and/or GDF9 proteins regulation for increasing the number of selected dominant follicles and, as a consequence, increasing ovulation rate; or, paradoxically, to inhibit antral follicle development and ovulation, to promote contraception in domestic animals and humans.

Information regarding BMPs, GDFs and their receptors, has also been obtained using in vitro culture of granulosa and theca cells and/or from follicles obtained in slaughterhouses and classified according to the follicular diameter or concentration of estradiol in the follicular fluid. Experiments using granulosa cells culture have shown that the action of BMP15 and GDF9

appears to be synergistic and variable according to species (McNatty et al., 2005). The synthesis of BMP15 and GDF9 by oocytes starts during the transition from primordial to primary follicles (Knight and Glister, 2006; Sanfins et al., 2018). In this phase, BMP15 and GDF9 act synergistically to coordinate the proliferation and organization of granulosa cells (Knight & Glister, 2006; Paulini & Melo, 2011; Sanfins et al., 2018). In in vitro culture, BMP15 and GDF9 have also been shown to act synergistically to induce complexes of bovine granulosa cells to form antrum-like structures (Alam et al., 2018). However, in bovine granulosa cells cultured in vitro in a homologous system, increased expression of GDF9 and BMP15 caused cellular luteinization (Paulini and Melo, 2021), which resembles what we have observed when the intrafollicular concentration of BMP15 was increased in dominant and preovulatory follicles in vivo.

Besides the effects on follicular cells, GDF9 and BMP15 seem to be involved in oocyte developmental competence through a complex signaling process (Paulini & Melo, 2011; Alam et al., 2018; Belli & Shimasaki, 2018). Caixeta et al. (2009), searching for competence markers in bovine oocytes, observed high levels of BMP15 and GDF9 mRNA expression, but without regulation throughout antral follicular development. Donnison and Pfeffer (2004) observed higher expression of GDF9 mRNA in more competent bovine oocytes, whereas the expression of BMP15 did not differ between more or less competent oocytes. In human oocytes, studies report that GDF9 and BMP15 mRNA are significantly correlated with the oocyte maturation process (Li et al., 2014) and are strongly associated with cumulus cell proliferation, expansion, and development of cumulus-oocyte complexes of women and buffalo (Huang and Wells, 2010; Kathirvel et al., 2013). In mice, Park et al. (2020) demonstrated that ovarian expression of BMP15 and GDF9 decrease with age, indicating that these factors may serve as new biomarkers of ovarian aging. In this sense, mutations that affect BMP15 levels were identified as associated with early ovarian failure (Patiño et al., 2017). Therefore, BMP15 and GDF9 are fundamental

for oocyte competence in different species, and influence cumulus function during follicular development and ovulation (Otsuka et al., 2011; Paulini and Melo, 2011).

Besides regulating cell proliferation and differentiation, several studies indicate that GDF9 and BMP15 act as regulators of steroidogenesis (Spicer et al., 2008). The addition of GDF9 in bovine theca cells culture decreases steroidogenesis stimulated by LH or IGF, by inhibiting the expression of steroidogenic enzymes (CYP11A1) and LH receptors (Spicer et al., 2008). A negative effect on estradiol synthesis was also observed after addition of GDF9 in granulosa cells culture treated with FSH and IGF (Spicer et al., 2006). When BMP15 was added to granulosa cells culture, it blocked the expression of FSH receptors (FSHR) and inhibited FSH-induced aromatase expression in the absence of androstenedione (Otsuka et al., 2001). Matsui et al. (2004) suggest the involvement of BMP15 in the process of follicular atresia, since BMP15 strongly inhibits FSH-stimulated pregnancy-associated protein (PAPP-A) expression in rat granulosa cells. In cases of inactivating mutations in sheep, reduced activity of growth factors induces early differentiation of developing follicles (Otsuka et al., 2001). The fact that granulosa cells from sheep heterozygous for the BMP15 inactivating mutation demonstrate greater LH responsiveness supports this hypothesis (McNatty et al., 2009).

Regulation of BMP15 and GDF9 receptors and signaling

The signaling of BMP15 and GDF9 proteins is mediated by the BMPR2 receptor, differing only in the type I receptor, with BMPR1b (ALK6) being involved in BMP15 signaling, and TGFBR1 binding to GDF9. Kayani et al. (2009) demonstrated that BMPR1a, BMPR1b, BMPR2, ActR1A, ActR1B, ActR2A and ActR2B receptors are expressed on theca and granulosa cells. However, Glister et al. (2010) using follicles from slaughterhouses, classified according to diameter, showed little regulation of BMP receptor expression during follicular growth. Jayawardana et al. (2006) using pre and post selection follicles (mean 7.7 mm and 15 mm, respectively), demonstrated that the expression of BMPR2 and BMPR1a was higher in

granulosa cells from post selection follicles. The same authors demonstrated that treatment with estradiol in granulosa cells obtained from follicles with approximately 4 mm of diameter increased the expression of BMPR2 and BMPR1a, and this expression was increased when combined with FSH. However, our in vivo studies have shown that BMPR2 and TGFRB1 receptor mRNA abundance is not differently regulated in granulosa cells of dominant and subordinate follicles (Gasperin et al., 2014). The same authors demonstrated that BMPR1b mRNA and protein are more abundant in granulosa cells from atretic subordinate follicles in cows, indicating a role during dominant follicle selection. In gilts, BMPR1b is downregulated after eCG+hCG treatment, indicating a role during luteinization (Hoyos-Marulanda et al., 2022). Therefore, it can be inferred that the BMPR1b receptor, in addition to regulating LH responsiveness, can also influence atresia. These results are in accordance with data obtained after active immunization in cows, which demonstrate that a partial decrease in BMP15 and GDF9 availability is associated with dominant follicle differentiation and increased ovulatory rate. Corroborating with this hypothesis, recently a high-fecundity allele named Trio has been described in cows, inducing upregulation of MAD family member 6 (SMAD6), an inhibitor of BMP/SMAD signaling pathway (Garcia-Guerra et al., 2018a). Cows carrying the Trio allele have multiple ovulations, with smaller preovulatory follicles and corpora lutea, compared to non-carriers, which resembles the features observed in ewes carrying mutations that increase ovulation rate.

Studies using knockout mice for the BMPR1a and BMPR1b have reported that these receptors have distinct functions during folliculogenesis, but act as suppressors of ovarian tumors (Edson et al., 2010). The same authors demonstrated that alterations in the normal pattern of expression of these receptors induce the formation of granulosa cell tumors. Tumor formations are also observed in the ovaries of ewes homozygous for the inactivating mutation of BMP15 (Juengel et al., 2000). Collectively, data available so far indicate that BMP15/GDF9

system is the main local regulator of follicle fate.

Other members of the TGF superfamily

Besides GDF9 and BMP15, other BMPs have been studied in the mammalian ovary, but most studies are restricted to cell cultures and gene expression characterization. In bovine theca cell culture, BMPs 4, 6, and 7 inhibited androgen synthesis, decreasing the enzyme HSD17A (Glister et al., 2005), whereas an increase in IGF-stimulated E2 synthesis was observed in granulosa cells (Glister et al., 2004). In prepubertal ewe lambs, Juengel et al. (2006) observed low expression of BMPs 2, 4 and 7 in non-atretic follicles in all cell types evaluated, with high levels of BMP6 expression in the oocyte. Furthermore, in humans, it is assumed that BMP6 may be involved in the ovulatory process, since it is related to the suppression of protease and leukocytes inhibitors and increase in neutrophil attraction by granulosa cells cultured in vitro (Akiyama et al., 2014). In cattle, Kayani et al. (2009) demonstrated the inhibitory action of BMP6 on the expression of steroidogenic enzymes such as CYP11A1, HSD3B1 and CYP19A1 in granulosa cells cultured in vitro.

To elucidate the in vivo regulation in pre-ovulatory follicles, our group investigated the mRNA expression of BMPs and their receptors (unpublished data) in bovine granulosa cells after ovulation induction with GnRH. After 0, 3, 6, 12 or 24 hours of GnRH administration, the cows were ovariectomized and mRNA expression for BMPs 1, 2, 4, 6, and BMPR1a, BMPR1b, BMPR2 and TGFBR1 receptors in granulosa cells was analyzed. The results demonstrated that mRNA expression of BMPs 1 and 4 was not regulated by GnRH treatment. However, there was an increase in BMP2 expression at 3 and 6 h after GnRH, returning to baseline levels at 12 and 24 h. BMP6 expression was not detected in granulosa cell samples. The expression of BMPR1a and BMPR1b was highest at 0 h, decreasing at 3 and 6 h with a transient increase at 12 h. The expression of BMP2 and BMPR1a were positively associated with estradiol concentrations between LH surge and ovulation, while estradiol levels decreased as BMPR2 expression

increased. Furthermore, mRNA expression of TGFBR1, BMPR1b and BMPR1a was negatively correlated with progesterone concentrations in follicular fluid. Therefore, the BMP system appears to play stimulatory and inhibitory paracrine actions in the local control of folliculogenesis and ovulation according to follicular stage.

The pattern of AMH expression in granulosa cells and follicular fluid around follicular deviation has also been evaluated by our group (Ilha et al., 2016). Interestingly, it was observed increased AMH and AMHR2 mRNA levels in dominant follicles at the expected time and after follicular deviation, compared to subordinate follicles. Furthermore, co-dominant follicles induced by FSH treatment had increased levels of AMH and AMHR mRNA (granulosa) and AMH protein in the follicular fluid. Thus, besides it well established roles during preantral follicle development, our results suggest that AMH is involved in dominant follicle selection.

As described above, the functions of the TGFβ superfamily vary according to origin of the factor used, the species, and the type of cell studied. Furthermore, data obtained from in vivo and in vitro models are sometimes conflicting. Despite evidence indicating a potential use of immunization against BMP15 and GDF9 in reproductive control in different species, the mechanisms involved are still not fully understood. It is possible that the different effects observed are due to specific differences and variability in the humoral response by the different peptides or adjuvants used. Also, conflicting data in the literature suggest caution in extrapolating results among different species (Juengel et al., 2004, 2006; McNatty et al., 2005). Contradictions are observed even in studies carried out with the same species and may result from different cell culture conditions and degree of cell differentiation (Juengel et al., 2004).

Conclusion

The identification of the participation of BMPs, GDF9 and related receptors in the local control of antral folliculogenesis is relatively recent. Many studies have been published using different species and models, often with contradictory results. The complete understanding of

the function of these factors is far from being elucidated and for this purpose it is essential to use reliable models. Regulatory studies of this system should also include regulatory proteins. A greater understanding of this local regulatory system will enable an advance in the knowledge of physiology, ovarian disorders, as well as enabling the generation of technologies to increase the ovulatory rate or contraception in different species.

Acknowledgments

The authors are thankful to FAPERGS and CNPq (grant number #16/2551-0000494-3); FAPERGS (grant number #22/2551-0000391-5); CNPq (grant number #310932/2021-1); and Capes (grant numbers #001).

References

Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. Reprod Sci. 2014; 21(6):772–7. https://doi.org/10.1177/1933719113518988. PMid: 24406789.

Alam MH, Lee J, Miyano T. GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. J Reprod Dev. 2018; 64(5):423–31. https://doi.org/10.1262/jrd.2018-078. PMid: 30033985.

Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. Reprod Med Biol. 2020; 19(1):13–23. https://doi.org/10.1002/rmb2.12292. PMid: 31956281.

Belli M, Shimasaki S. Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. Vitam Horm. 2018; 107:317–48. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.12.003. PMid: 29544636.

Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MAN. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of Bos indicus: an approach to identify marker

genes for developmental competence. Reprod Fertil Dev. 2009; 21(5):655-64. https://doi.org/10.1071/RD08201. PMid: 19486602.

Crawford JL, McNatty KP. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. Mol Cell Endocrinol. 2012; 348(1):339–43. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.033. PMid: 21970812.

Davis KA, Klohonatz KM, Mora DSO, Twenter HM, Graham PE, Pinedo P, Eckery DC, Bruemmer JE. Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth differentiation factor-9 on ovarian function in mares. Anim Reprod Sci. 2018; 192:69–77. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.015.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth Differentiation Factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature.1996; 383(6600):531–5. https://doi.org/10.1038/383531a0. PMid: 8849725.

Donnison M, Pfeffer PL. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. Biol Reprod. 2004; 71(6):1813–21. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032367. PMid: 15286031.

Edson MA, Nalam RL, Clementi C, Franco HL, DeMayo FJ, Lyons KM, Pangas SA, Matzuk MM. Granulosa cell expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. Mol Endocrinol. 2010; 24(6):1251–66. https://doi.org/10.1210/me.2009-0461. PMid: 20363875.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nat Genet. 2000; 25(3):279–83. https://doi.org/10.1038/77033. PMid:10888873.

Garcia-Guerra A, Kamalludin MH, Kirkpatrick BW, Wiltbank MC. Trio a novel bovine high-fecundity allele: II. Hormonal profile and follicular dynamics underlying the high ovulation rate. Biol Reprod. 2018a; 98(3): 335-49. https://doi.org/10.1093/biolre/iox156. PMid: 29425274.

Garcia-Guerra A, Wiltbank MC, Battista SE, Kirkpatrick BW, Sartori R. Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: lessons learned from multiple ovulation models. Anim Reprod. 2018b; 15(1): 660–79. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0027.

Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, Bordignon V, Duggavathi R, Buratini J, Oliveira JFC, Gonçalves PBD. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. Anim Reprod Sci. 2014; 144(3-4):72–8. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.002. PMid: 24388700.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. Reproduction. 2004; 127(2):239–54. https://doi.org/10.1530/rep.1.00090. PMid: 15056790.

Glister C, Richards SL, Knight PG. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal bmp signaling? Endocrinology. 2005; 146(4):1883–92. https://doi.org/10.1210/en.2004-1303. PMid: 15625241.

Glister C, Satchell L, Knight PG. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. Reproduction. 2010; 140(5):699–712. https://doi.org/10.1530/REP-10-0216. PMid: 20739376.

Haas CS, Oliveira FC, Rovani MT, Ferst JG, Vargas Jr SF, Vieira AD, Mondadori RG, Pegoraro LMC, Gonçalves PBD, Bordignon V, Ferreira R, Gasperin BG. Bone morphogenetic protein 15 intrafollicular injection inhibits ovulation in cattle. Theriogenology. 2022; 182:148–54. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.010. PMid: 35176680.

Haas CS, Rovani MT, Oliveira FC, Vieira AD, Bordignon V, Gonçalves PBD, Ferreira R, Gasperin BG. Expression of growth and differentiation Factor 9 and cognate receptors during final follicular growth in cattle. Anim Reprod. 2016; 13:756–61. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR789.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (ovis aries). Biol Reprod. 2004; 70 (4):900–9. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093. PMid: 14627550.

Heath DA, Pitman JL, McNatty KP. Molecular forms of ruminant BMP15 and GDF9 and putative interactions with receptors. Reproduction. 2017; 154 (4):521–34. https://doi.org/10.1530/REP-17-0188. PMid: 28733348.

Hoyos-Marulanda V, Haas CS, Goularte KL, Rovani MT, Mondadori RG, Vieira AD, Gasperin BG, Lucia T. Expression of steroidogenic enzymes and TGFβ superfamily members in follicular cells of prepubertal gilts with distinct endocrine profiles. Zygote. 2022; 30(1): 65–71. https://doi.org/10.1017/S0967199421000289. PMid: 33966679.

Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. Mol Hum Reprod. 2010; 16(10):715–25. https://doi.org/10.1093/molehr/gaq031. PMid: 20435609.

Ilha GF, Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, Macedo MP, Neto OA, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PBD. Regulation of Anti-Müllerian hormone and its receptor expression around follicle deviation in cattle. Reprod Domest Anim. 2016; 51(2):188-94. https://doi.org/10.1111/rda.12662. PMid: 29162700.

Jayawardana BC, Shimizu T, Nishimoto H, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A. Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. Reproduction. 2006; 131 (3):545–53. https://doi.org/10.1530/rep.1.00885. PMid: 16514197.

Juengel JL, Hudson NL, Berg M, Hamel K, Smith P, Lawrence SB, Whiting L, McNatty KP. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. Reproduction. 2009; 138(1):107–14. https://doi.org/10.1530/REP-09-0009. PMid: 19439562.

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. Biol Reprod. 2004; 70(3):557–61. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023333. PMid:14585806.

Juengel JL, Quirke LD, Tisdall DJ, Smith P, Hudson NL, McNatty KP. Gene expression in abnormal ovarian structures of ewes homozygous for the inverdale prolificacy gene. Biol Reprod. 2000; 62 (6):1467–78. https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1467. PMid: 10819746.

Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty KP. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. Reproduction. 2006; 131(3):501–13. https://doi.org/10.1530/rep.1.00958. PMid: 16514193.

Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during in vitro maturation of buffalo (Bubalus bubalis) cumulus–oocyte complexes. SpringerPlus. 2013; 2 (1): 206. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-206. PMid: 23724366.

Kayani AR, Glister C, Knight PG. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. Reproduction. 2009; 137 (1): 67–78. https://doi.org/10.1530/REP-08-0198. PMid: 18936084.

Knight PG, Glister C. TGF-β superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006; 132(2):191–206. https://doi.org/10.1530/rep.1.01074. PMid: 16885529.

Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX, Yang DZ. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. Reprod Biol Endocrinol. 2014; 12:81. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-81. PMid: 25139161.

Matsui M, Sonntag B, Hwang SS, Byerly T, Hourvitz A, Adashi EY, Shimasaki S, Erickson GF. Pregnancy-associated plasma protein-a production in rat granulosa cells: stimulation by follicle-stimulating hormone and inhibition by the oocyte-derived bone morphogenetic protein-15. Endocrinology. 2004; 145 (8):3686–95. https://doi.org/10.1210/en.2003-1642. PMid: 15087430.

McNatty KP, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Juengel JL, Moore LG. Gonadotrophin-responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant sheep. Reproduction. 2009; 138 (3):545–51. https://doi.org/10.1530/REP-09-0154. PMid: 19535491.

McNatty KP, Hudson NL, Whiting L, Reader KL, Lun S, Western A, Heath DA, Smith P, Moore LG, Juengel JL. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. Biol Reprod. 2007; 76(4):552–60. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054361. PMid: 17093201.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. Reproduction. 2005; 129(4):481–7. https://doi.org/10.1530/rep.1.00517. PMid: 15798022.

McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. Reproduction. 2004; 128(4):379–86. https://doi.org/10.1530/rep.1.00280. PMid: 15454632.

Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. Mol Reprod Dev. 2011; 78(1): 9–21. https://doi.org/10.1002/mrd.21265. PMid: 21226076.

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits Follicle-Stimulating Hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. J Biol Chem. 2001; 276 (14):11387–92. https://doi.org/10.1074/jbc.M010043200. PMid: 11154695.

Park MJ, Ahn JW, Kim KH, Bang J, Kim SC, Jeong JY, Choi YE, Kim CW, Joo BS. Prediction of ovarian aging using ovarian expression of BMP15, GDF9, and C-KIT. Exp Biol Med. 2020; 245(8):711–9. https://doi.org/10.1177/1535370220915826. PMid: 32223330.

Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, Agapiou D, Gilchrist RB, Laissue P, Harrison CA. BMP15 mutations associated with primary ovarian

insufficiency reduce expression, activity, or synergy with GDF9. J Clin Endocrinol Metab. 2017; 102(3):1009-19. https://doi.org/10.1210/jc.2016-3503. PMid: 28359091.

Paulini F, Melo EO. Effects of Growth and Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 overexpression on the steroidogenic metabolism in bovine granulosa cells in vitro. Reprod Domest Anim. 2021; 56(6):837–47. https://doi.org/10.1111/rda.13923. PMid:33683747.

Paulini F, Melo EO. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. Reprod Domest Anim. 2011; 46(2):354–61. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x. PMid: 21198974.

Rossi RODS, Costa JJN, Silva AWB, Saraiva MVA, Van Den Hurk, R, Silva JRV. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. Zygote. 2016; 24(1): 1–17. https://doi.org/10.1017/S096719941400077X. PMid: 25613521.

Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves PBD. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. Anim Reprod. 2018; 14(2):383-91. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR832.

Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. J Assist Reprod Genet. 2018; 35(10):1741–50. https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4. PMid: 30039232.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 2003; 113(6):685–700. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X.

Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. J Endocrinol. 2006; 189(2):329–39. https://doi.org/10.1677/joe.1.06503. PMid: 16648300.

Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. Biol Reprod. 2008; 78(2):243–53. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063446. PMid: 17959852.

Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. Mol Endocrinol. 2001; 15(6):854–66. https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662. PMid: 11376106.

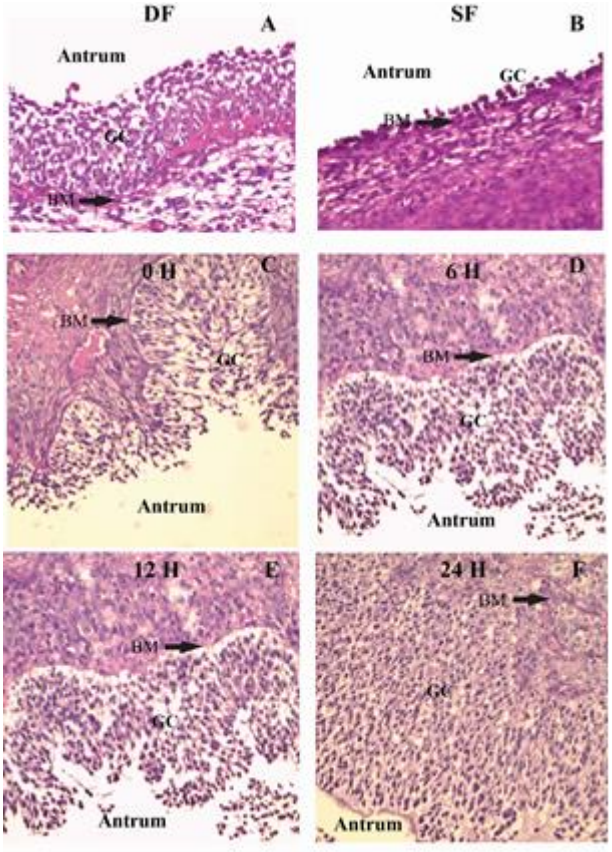

Figure 1. Representative images (PAS staining) of follicles used to characterize gene expression. (A) Dominant (healthy) and (B) subordinate (atretic) follicles collected after follicular deviation; (C), (D), (E), (F) preovulatory follicles collected 0, 6, 12 and 24 h after GnRH treatment, respectively. DF: dominant follicle; SF: subordinate follicle; GC: granulosa cells; BM: basal membrane.

Deviation model	
Dominant follicle	**Subordinate follicle**
↑AMH (mRNA and protein) and AMHR mRNA ↑NPR1, NPR2 and NPR3 mRNA ↑FSHR; LHCGR; CCND2; CYP19A1 mRNA ↑INHBA mRNA ↑INHBB mRNA ↑INHA mRNA ↑BMP4	↑BMPR1B mRNA and protein ↑Cleaved caspase 3 ↑Phosphorylated isoform STAT3 ↑OSMR mRNA ↑Leptin immunostaining ↓ LEPROT, ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA ↓ PTGFR mRNA ↓ ESR1 and ESR2 mRNA
Intrafollicular injection	
Inhibited DF growth	**No effect on DF growth**
PPARG agonist Fulvestrant (ERs inhibitor) FGF10 BMP15	GDF9 Leptin

Figure 2. Summary of results from studies performed by our group investigating the local control of dominant follicle selection in cows. AMH: Anti-Mullerian hormone; AMHR: Anti-Mullerian hormone receptor; NPR: Natriuretic peptide receptor; FSHR: Follicle stimulating hormone receptor; LHCGR: Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor; CCND2: Cyclin D2; CYP19A1: Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1; INHBA: Inhibin subunit beta A; INHBB: Inhibin subunit beta B; INHA: Inhibin subunit alpha; BMP4: Bone morphogenetic protein 4; BMPR1B: Bone morphogenetic protein receptor type.

Ovulation model	
Gene	**Time relative to 0 h (GnRH i.m. administration)**
↑ BMPR2	12 h
↑ TGFBR1	12 h
↑ OSMR	12 and 24 h
↑ IL6ST	6 h
↑ NPPC	3 and 6 h
↑ NPR1	24 h
↑ BMP2	3 and 6 h
↑ BMPR1A	12 h
↑ BMPR1B	12 h
↓ PPARG	3 and 6 h
↓ BMPR1B	3, 6 and 24 h
↓ NPR3	6, 12 and 24 h
↓ BMPR1A	3 and 6 h
Intrafollicular injection	
Inhibited ovulation	**No effect on ovulation**
ERK1/2 inhibitor BMP15	N/A

Figure 3. Summary of results from studies performed by our group investigating the local control of ovulation in cows. BMPR2: Bone morphogenetic protein receptor type 2; TGFBR1: Transforming growth factor beta receptor 1; OSMR: Oncostatin M receptor; IL6ST: Interleukin 6 cytokine family signal transducer; NPPC: Natriuretic peptide C; NPR1: Natriuretic peptide receptor 1; BMP2: Bone morphogenetic protein 2; BMPR1A: Bone morphogenetic protein receptor type 1A; BMPR1B: Bone morphogenetic protein receptor type 1B; PPARG: Peroxisome proliferator activated receptor gamma; NPR3: Natriuretic peptide receptor; ERK1/2: Extracellular signal-regulated protein kinase; BMP15: Bone morphogenetic protein 15. Green arrow: Upregulation in granulosa cells (GC). Red arrow: Downregulation in GC.

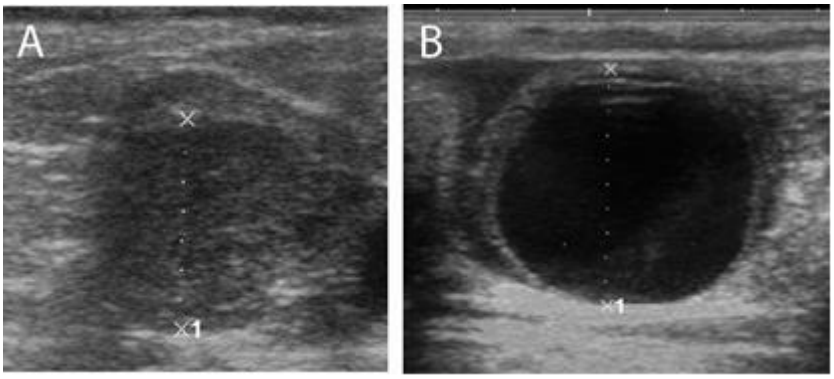

Figure 4. Corpus luteum with 23.2 mm 12 days after IFI with PBS (A). Luteal cyst with 31.6 mm 12 days after IFI with BMP15 (B). Adapted from Haas et al. (2022).

2.2 Artigo 2

A administração parenteral de flunixina meglumina em dose terapêutica não bloqueia a ovulação em fêmeas bovinas

Fabiane Pereira de Moraes, Camila Amaral D'Avila, Arnaldo Diniz Vieira, Monique Tomazele Rovani, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Bernardo Garziera Gasperin.

Será submetido à revista Animal Reproduction

Short communication

Running title: Efeito da flunixina meglumina na ovulação

A administração parenteral de flunixina meglumina em dose terapêutica não bloqueia a ovulação em fêmeas bovinas

Fabiane Pereira de Moraes[1] (https://orcid.org/0000-0003-2502-4108), Camila Amaral D'Avila[1] (https://orcid.org/0000-0002-8390-6216), Arnaldo Diniz Vieira[1] (https://orcid.org/0000-0003-2502-4108), Monique Tomazele Rovani[2] (https://orcid.org/0000-0001-8257-3635), Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro[3], Paulo Bayard Dias Gonçalves[4] (https://orcid.org/0000-0002-0671-1466), Bernardo Garziera Gasperin[1*] (https://orcid.org/0000-0002-3715-2345)

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

[2] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

[3] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Capão do Leão, RS, Brasil.

[4] Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.

[*]Autor correspondente: Bernardo Garziera Gasperin, e-mail: bernardo.gasperin@ufpel.edu.br, Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil.

Resumo

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a síntese de prostaglandinas, que são essenciais para a ovulação. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito de duas administrações, do AINE flunixina meglumina (FM), por via intramuscular, sobre a ovulação induzida por GnRH. Duas aplicações de FM (1.1 mg/ kg) por via intramuscular realizadas às 16h e 26h após a indução da ovulação com GnRH não foram capazes de bloquear a ovulação.

Em conclusão, a administração parenteral de FM, em dose terapêutica, não bloqueou a ovulação, demonstrando não ser um modelo apropriado para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório.

Palavras-chave: ovulação, prostaglandinas, bovinos, anti-inflamatório.

Introdução

Em bovinos, as pesquisas sobre o processo ovulatório e de alternativas para induzir a ovulação síncrona são de grande interesse para ampla utilização de biotécnicas. As prostaglandinas desempenham várias funções na fisiologia reprodutiva e são essenciais para a luteólise e ovulação. As principais prostaglandinas envolvidas na ovulação são a prostaglandina E2 (PGE) e a prostaglandina F2 alfa (PGF), porém, pouco se sabe sobre a função individual de cada uma delas nesse processo e nas diferentes espécies.

Já foi demonstrado que a administração de PGF é capaz de induzir ovulação em novilhas pré-púberes (Leonardi et al., 2012) e, quando utilizada em protocolos de IATF, em vacas de corte lactantes e novilhas púberes, foram observadas taxas de prenhez semelhantes às obtidas com os indutores de ovulação benzoato e cipionato de estradiol (Pfeifer et al., 2014). Entretanto, em um estudo do nosso grupo foi demonstrado que a administração de PGF por via intrafolicular não antecipa o momento da ovulação e ainda, o tratamento com PGF intramuscular, 23 h após indução da ovulação com GnRH, reduziu a vascularização folicular, demonstrando que a PGF de forma isolada não induz a ovulação em bovinos (Pereira De Moraes et al., 2021). Outro estudo, realizado em vacas superovuladas demonstrou que as concentrações de PGE no fluido folicular imediatamente antes da ovulação são superiores (484.21 ng/mL) às de PGF (101.01 ng/mL). Assim, sugere-se que a PGE é mais relevante para ovulação e formação do corpo lúteo (CL), como mediador parácrino do pico de LH em bovinos (Berisha et al., 2019), tornando importante a investigação do papel da PGE e da interação entre PGF e PGE no processo ovulatório nessa espécie.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem as enzimas prostaglandina endoperóxido sintase 1 (PTGS1) e PTGS2 e, consequentemente a síntese das prostaglandinas, podendo inibir a ovulação em diferentes espécies (Murdoch & Dunn, 1983; De Silva & Reeves, 1985; Fonseca et al., 2017; Vernunft et al., 2022). Desta forma, a validação de um modelo para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório *in vivo*, através da inibição da ovulação utilizando AINE por via parenteral, tem grande importância para a melhor compreensão da cascata ovulatória na espécie bovina, servindo também de modelo experimental para outras espécies monovulatórias. Nesse último caso, AINEs podem ser utilizados após a IA por laparoscopia em ovinos, porém, seus possíveis efeitos inibitórios sobre a ovulação são desconhecidos. Com base no acima exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de duas administrações (1.1 mg/Kg), por via intramuscular, do AINE flunixina meglumina (FM) sobre a ovulação induzida por GnRH em vacas.

Materiais e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel (0288-2015)

Visando investigar se duas administrações do AINE FM é capaz de inibir a ovulação em bovinos quando aplicado via i.m, fêmeas cíclicas, não gestantes e não lactantes (n=13), com ECC entre 2,5 e 4 (1-5) foram submetidas a um protocolo hormonal baseado na introdução de um DIV contendo 1 g de P4 (Primer®, Agener União), mantido durante nove dias, juntamente com a aplicação i.m de 2 mg de BE (RIC-BE®, Agener União) no D0. A partir do D7, os folículos foram acompanhados diariamente por ultrassonografia transretal, para identificação dos folículos dominantes em crescimento. No D8, foi realizada a aplicação i.m de 241 µg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União) e no D9, foram removidos os DIVs. Após 24 h da remoção dos DIVs foi aplicado 10 µg acetato de buserelina (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal) (hora 0 = H0), por via i.m, em todos os animais com folículos com diâmetro ≥

11 mm. A partir deste momento, os animais foram distribuídos, de acordo com o diâmetro folicular, igualmente equilibrado entre dois grupos: Controle (n=5), sem nenhum tratamento adicional; e AINE FM (n=5), que após 16 h da aplicação do hormônio sintético análogo ao GnRH, recebeu a aplicação i.m de 1,1 mg/kg de FM (Flumedin®, Jofadel) (H16) e uma nova aplicação de FM (1,1 mg/kg, i.m) 26 h após o GnRH (H26), conforme dose terapêutica recomendada (1.1- 2.2 mg/Kg no intervalo de 12-24 h) por Viana (2014). Os folículos pré-ovulatórios foram acompanhados por ultrassonografia transretal a cada 12 horas para identificação do momento da ovulação. Nos dias cinco e sete após a aplicação de GnRH, foi realizada uma nova avaliação dos animais por ultrassonografia transretal, com o objetivo de verificar a presença de um CL no ovário onde estava presente o folículo pré-ovulatório.

Análise estatística

A taxa de ovulação foi comparada entre os grupos utilizando o teste de qui-quadrado, utilizando um nível de significância de 5%.

Resultados

Todos os animais do grupo controle (5/5) e 80% dos animais (4/5) do grupo AINE FM ovularam até 40h após o GnRH (Tab. 1). Um dos animais (1/5) do grupo AINE FM desenvolveu uma estrutura cística que permaneceu no ovário até o sétimo dia após a aplicação do GnRH.

Discussão

Contrariando nossa hipótese, a administração do AINE FM por via intramuscular na dose e momentos testados não bloqueou a ovulação. De forma semelhante, Donnelly et al. (2019) testaram o uso de FM (1.1 mg/kg intravenoso) em éguas, uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos e não observaram atraso ou bloqueio da ovulação, nem efeito sobre a função luteal pós-ovulatória. Cuervo-Arango (2011) observou que a FM (1,7 mg/kg) foi capaz de bloquear a ovulação em éguas quando administrada 0, 12, 24 e 36 h após a administração de hCG ou 24 e 36 h após hCG, sendo que estes grupos apresentaram menores concentrações de

progesterona. Porém, mesmo os animais com estruturas anovulatórias apresentaram luteinização e síntese de progesterona (≥ 2 ng/mL) a partir do quinto dia após a hCG. No mesmo estudo, os tratamentos com FM em dose única (24 ou 30 h após hCG), não afetaram a ovulação e síntese de progesterona subsequente em comparação ao grupo controle.

Devido ao mecanismo de ação dos AINEs, estudos relataram efeitos inibitórios sobre a ovulação em diferentes espécies. Murdoch e Dunn (1983) testaram a aplicação de indometacina no interior de folículos pré-ovulatórios de ovelhas e observaram que o AINE foi capaz de bloquear a ovulação, sem alterar as concentrações de progesterona em relação aos animais não tratados. Em outro estudo, o mesmo AINE foi administrado em vacas pelas vias intramuscular, intrauterina e intrafolicular, sendo observado o bloqueio da ovulação nos animais que receberam a indometacina no interior do folículo (De Silva e Reeves, 1985). A aplicação de FM no momento da inseminação, também demonstrou efeitos negativos sobre taxa de prenhez em cabras (Fonseca et al., 2017). Cuervo-Arango e Domingo-Ortiz (2011) observaram que éguas tratadas com FM (2 mg/kg), duas vezes ao dia, desde que apresentaram um folículo pré-ovulatório ≥32 mm até o momento da ovulação, apresentaram bloqueio da ovulação em 83% dos casos (5/6) e desenvolvimento de folículos não rompidos luteinizados.

Recentemente, foi testado em bovinos o uso de inibidores não seletivos (indometacina e FM), seletivos PTGS2 (meloxicam) e altamente seletivos PTGS2 (NS-398) por via intrafolicular, em folículos pré-ovulatórios 16 h após a administração de GnRH, mesmo momento utilizado no presente estudo. Os autores observaram que a indometacina (70 µM) e FM (338 µM) bloquearam a ovulação de todos os folículos injetados, enquanto o NS-398 não inibiu a ovulação e o meloxicam foi efetivo somente na maior dose (1725 µM), inibindo 75% das ovulações. No mesmo estudo, indometacina, meloxicam e NS-398 não afetaram a produção de estradiol e progesterona *in vitro*. Ainda, foi demonstrada a redução nas concentrações intrafoliculares de PGE 21 h após a indução da ovulação com GnRH (5 h após os tratamentos),

mesmo quando utilizados os AINEs e/ou concentrações que não foram capazes de bloquear a ovulação (Vernunft et al., 2022). Em um estudo conduzido pelo nosso grupo, observamos que o tratamento sistêmico com o AINE FM 17 h após a indução da ovulação com GnRH inibiu a síntese de PGF no interior do folículo, avaliada 24h após o GnRH (7 h após o AINE) (Pereira De Moraes et al., 2021). Portanto, é possível que mesmo com baixas concentrações de prostaglandinas no interior do folículo o processo ovulatório possa ocorrer ou ainda que, na dose testada, a inibição não tenha uma duração suficiente para bloquear a ovulação.

A partir dos resultados encontrados na literatura e de acordo com Donnelly et al. (2019), possivelmente não foi observado efeito inibitório do AINE FM sobre a ovulação neste estudo em virtude de que os trabalhos que observaram bloqueio ou falha ovulatória, utilizaram altas doses e maior frequência de aplicação, ou ainda administraram o AINE por via intrafolicular. Aiumlamai et al. (1990) descreveram uma rápida redução na concentração de PGFM sérica após uma administração intravenosa de FM (2,2 mg/kg) que persistiu durante seis horas em vacas ovariectomizadas, sendo recomendado pelos autores quatro administrações diárias de FM para obtenção de um pleno efeito sobre a síntese de prostaglandinas. Portanto, supostamente, para se observar os efeitos inibitórios do AINE na ovulação, seriam necessárias mais aplicações ou ainda alteração da via de administração.

Conclusão

A administração parenteral de duas aplicações do AINE FM, em dose terapêutica, não bloqueou a ovulação em fêmeas bovinas, demonstrando não ser um bom modelo para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório, no entanto, possíveis efeitos deletérios sobre o desempenho reprodutivo não podem ser descartados, o que não foi avaliado no presente estudo. Novas pesquisas devem ser conduzidas utilizando este AINE por via intrafolicular para o bloqueio da ovulação.

Agradecimentos

PBDG recebeu financiamento da FAPERGS (#22/2551-0000391-5). BGG recebeu financiamento do CNPq (#310932/2021-1) e FAPERGS (#21/2551-0002278-7). FPM recebeu financiamento da Capes (Código de financiamento 001).

Referências

Aiumlamai S, Odensvik K, Stabenfeldt G, Kindahl H. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. Zentralbl Veterinarmed A. 1990; 37:16–22. https://doi.org/10.1111/J.1439-0442.1990.TB00871.X.

Berisha B, Rodler D, Schams D, Sinowatz F, Pfaffl MW. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00467.

Cuervo-Arango J, Domingo-Ortiz R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. Theriogenology. 2011; 75:707–14. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.011.

Cuervo-Arango J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. Anim Reprod Sci. 2011; 127:84–90. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.008.

De Silva M, Reeves JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. Reproduction. 1985; 75:547–9. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0750547.

Donnelly CG, Sones JL, Dockweiler JC, Norberg LA, Norberg LE, Cheong SH, Gilbert RO. Effects of flunixin meglumine on postponement of ovulation in mares. Am J Vet Res. 2019; 80:306–10. https://doi.org/10.2460/AJVR.80.3.306.

Fonseca JF, Alvim GP, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Brair VL, Brandão FZ, Facó O. Reproductive features and use of an anti-inflammatory drug in estrus-induced dairy goats

artificially inseminated in a standing position with cervix immobilization. Reprod Biol. 2017; 17:268–73. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.07.002.

Leonardi CEP, Pfeifer LFM, Rubin MIB, Singh J, Mapletoft RJ, Pessoa GA, Bainy AM, Silva CAM. Prostaglandin F2α promotes ovulation in prepubertal heifers. Theriogenology. 2012; 78:1578–82. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.030.

Murdoch WJ, Dunn TG. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. Reproduction. 1983; 69:671–5. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690671.

Pereira de Moraes F, Amaral D'Avila C, Caetano de Oliveira F, Ávila de Castro N, Diniz Vieira A, Schneider A, Pfeifer LFM, Pegoraro LMC, Ferreira R, Ferst JG, Rovani, MT, Corrêa MN, Gonçalves PBD, Lucia Jr T, Gasperin BG. Prostaglandin F2α regulation and function during ovulation and luteinization in cows. Theriogenology. 2021; 171:30–7. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.008.

Pfeifer LFM, Leonardi CEP, Castro NA, Viana JHM, Siqueira LGB, Castilho EM, Singh J, Krusser RH, Rubin MIB. The use of PGF2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. Theriogenology. 2014; 81:689–95. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.11.016.

Vernunft A, Lapp R, Viergutz T, Weitzel JM. Effects of different cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin E_2 production, steroidogenesis and ovulation of bovine preovulatory follicles. Journal of Reproduction and Development. 2022; 68:2021–148. https://doi.org/10.1262/jrd.2021-148.

Viana, FAB. Guia Terapêutico Veterinário. 3ª edição. Editora CEM. Belo Horizonte, Brasil, 2014.

Tabela 1- Diâmetro folicular e ocorrência de ovulação em vacas tratadas ou não com 1,1 mg/Kg AINE FM às 16 h e 26 h após indução da ovulação com GnRH.

Grupo	n	Diâmetro folicular* (Média) mm	Ovulação até 42 h* (%)
CONTROLE	5	12,5	100 (5/5)
AINE FM	5	12,1	80 (4/5)

*Referente ao momento de aplicação de GnRH.

2.3 Artigo 3

Ação da hCG sobre a função luteal e características do corpo lúteo em vacas

Fabiane Pereira de Moraes; Ricardo Della Méa; Jéssica Lazzari; Gabriel Maggi Arnaldo Diniz Vieira; Rafael Gianella Mondadori; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro; Monique Tomazele Rovani; Paulo Bayard Dias Gonçalves; Bernardo Garziera Gasperin.

Será submetido à revista Theriogenology

Ação da hCG sobre a função luteal e características do corpo lúteo em vacas

Fabiane Pereira de Moraes[1], Ricardo Della Méa[2], Jéssica Lazzari[1], Gabriel Maggi[1] Arnaldo Diniz Vieira[1], Rafael Gianella Mondadori[1], Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro[3], Monique Tomazele Rovani[4], Paulo Bayard Dias Gonçalves[5], Bernardo Garziera Gasperin[1*]

[1] Programa de Pós-graduação em Veterinária Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil, [2] Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, [3] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Capão do Leão, RS, Brasil. [4] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, [5] Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil.
*Autor correspondente: bernardo.gasperin@ufpel.edu.br, Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Capão do Leão, RS, Brasil.

RESUMO
A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é um hormônio glicoproteico com ação semelhante ao LH e efeito luteotrófico, que pode ser utilizada como indutor de ovulação em protocolos de IATF e TETF. Entretanto, seu uso apresenta variações em relação a dose e resultados e devido ao seu alto custo, a viabilidade econômica da sua utilização necessita ser melhor avaliada. Este estudo teve como objetivo determinar a curva de concentração sérica de β-hCG ao longo do tempo; avaliar o efeito de 1000 UI de hCG, combinado ou não ao GnRH, sobre a função luteal, características do corpo lúteo (perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência) e luteinização. No experimento 1, a concentração sérica de β-hCG foi mensurada 0 h (D0), 24 h (D1), 96 h (D4) e 168 h (D7) após tratamento com hCG por via intramuscular, sendo observado o pico de concentração 24h após aplicação, não sendo detectadas concentrações no D7 (inferiores a 0,2 mUI/mL). No segundo experimento, a associação de GnRH + hCG para a indução da ovulação refletiu em maior concentração de progesterona sete dias após o tratamento, quando comparada ao grupo GnRH ($P<0,05$) e não afetou a perfusão sanguínea e as características estruturais do corpo lúteo ($P>0,05$). No experimento 3, ao comparar os indutores de ovulação, GnRH e hCG, de forma isolada, foram observados maior diâmetro ($P=0,01$), área ($P=0,04$) e circunferência ($P=0,02$) do corpo lúteo no grupo hCG, sem efeito sobre a concentração de progesterona. No experimento 4, a administração de hCG não afetou as concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona 24 h após a sua administração por via intramuscular ($P>0,05$). Em conclusão, a combinação de GnRH e hCG melhorou a função luteal, enquanto a hCG isoladamente resultou em corpos lúteos maiores. O processo de luteinização não diferiu entre os indutores GnRH e hCG.
Palavras-chave: Luteotrófico, ovulação, gonadotrofina coriônica humana, progesterona.

1. Introdução

Existe grande interesse econômico em melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos e para isso a utilização de biotecnologias, como a IATF e TETF, que permitem a manipulação hormonal do ciclo estral e a IA ou TE em momento previamente estabelecido, é fundamental. Ainda, a busca pelo conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva e ação hormonal constitui uma alternativa para melhorar os protocolos hormonais existentes e as taxas de prenhez obtidas a partir deles.

Dentre os hormônios indutores de ovulação disponíveis comercialmente está a gonadotrofina coriônica humana (hCG), uma glicoproteína com atividade semelhante ao hormônio luteinizante (LH) e com ação luteotrófica. A hCG atua de forma independente da

hipófise, se ligando aos receptores do LH (LHCGR) presentes na parede folicular. A sequência de extensão do peptídeo carboxi-terminal (CTP) de 24 aminoácidos da subunidade β da hCG confere a esse hormônio uma meia-vida mais longa em relação ao LH [1]. Concentrações plasmáticas elevadas se mantiveram por até 30 h, sem retornarem às concentrações basais por 66 h após o tratamento com 3000 UI de hCG em novilhas [2]. O efeito luteotrófico da hCG é atribuído a um aumento de tamanho das células lúteas, com incremento no número de células lúteas grandes, concomitante com uma redução no número de células lúteas pequenas, um aumento da área de superfície, volume e diâmetro do corpo lúteo (CL), o que resulta em maior capacidade esteroidogênica do CL [3,4]. Seu uso já foi testado no suporte ao desenvolvimento folicular final, como indutor de ovulação e ainda para a indução de corpos lúteos acessórios no início do diestro, visando maiores concentrações de progesterona (P4) e, consequentemente, melhores taxas de prenhez [5–8]. Apesar disso, os estudos utilizam doses variadas e os resultados ainda são inconsistentes e contraditórios. Ainda, levando em consideração o custo elevado desta gonadotrofina, a viabilidade econômica da utilização da hCG necessita ser melhor avaliada, por meio da identificação de uma dose efetiva e com melhor relação custo-benefício.

Um estudo recente comparou os indutores de ovulação hCG (3000 UI) e GnRH em vacas leiteiras que receberam embrião proveniente de produção *in vitro* e observaram que vacas tratadas com hCG tiveram maior taxa de prenhez (55%), quando comparadas aos animais que receberam GnRH (26,7%)[9]. Em outro estudo [10] também foram comparadas duas doses de hCG (1000 UI e 3000 UI) ao GnRH, em que foi observado maior tamanho de CL em animais tratados com 3000 UI de hCG e maior taxa de prenhez cumulativa após duas IATFs, em relação aos grupos GnRH e 1000UI de hCG. Quando utilizado 1500 UI de hCG em diferentes momentos, no dia da IA (dia 0), sete dias após a IA (dia 7), 14 dias após a IA (dia 14) ou nos dias 0, 7 e 14, não foi observada diferença entre os grupos tratados com hCG e o grupo controle (solução fisiológica) em relação à concentração de P4 e taxa de prenhez [11]. Por outro lado, o tratamento com hCG (3000 UI) melhorou as taxas de ovulação ao longo do ano em vacas leiteiras em anestro e as taxas de prenhez em vacas leiteiras em anestro sob condições de estresse térmico, em comparação ao tratamento com GnRH [12].

A administração de 3.000 UI de hCG no dia 7 do ciclo estral, em vacas não lactantes, provocou um aumento temporário do fluxo sanguíneo do CL 1 h após o tratamento e induziu um aumento de longo prazo na concentração de P4 durante o período de observação de 48 h após a aplicação de hCG [13]. Na tentativa de substituir o GnRH por hCG (1500 UI) como indutor de ovulação final nos protocolos *Presynch* e *Ovsynch*, foram encontrados melhores resultados para taxa de prenhez quando utilizado o hormônio GnRH, sendo desaconselhado pelos autores a substituição [14].

Com base nos estudos citados, é possível verificar que a dose de hCG utilizada varia amplamente, assim como os resultados referentes ao desempenho reprodutivo dos animais, tornando válida uma investigação mais aprofundada do uso de hCG como indutor de ovulação e como agente luteotrófico em protocolos de IATF e TETF. O uso de uma dose viável economicamente que seja capaz de induzir a ovulação síncrona, o conhecimento da concentração plasmática (β-hCG) ao longo do tempo, e a identificação dos efeitos sobre função luteal e taxa de prenhez, possibilitaria concluir sobre a viabilidade do uso da hCG nas biotécnicas da reprodução. Dessa forma, os objetivos deste estudo são: 1) Determinar a curva de concentração sérica de β-hCG após a aplicação de 1000 UI do hormônio por via intramuscular; 2) Avaliar o efeito de 1000 UI de hCG combinado ou não ao GnRH sobre a função luteal (produção de progesterona), perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência do corpo lúteo; 3) Mensurar o efeito de 1000 UI de hCG sobre as concentrações intrafoliculares dos hormônios esteroides, estradiol e progesterona durante a luteinização (24 horas após a indução da ovulação).

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto nº 41037) e da Universidade Federal de Pelotas (código 31587-2020).

2.1 Experimento 1- Curva de concentração de β-hCG ao longo do tempo

Este experimento teve como objetivo avaliar a curva de concentração sérica de β-hCG ao longo do tempo após indução da ovulação com 1000 UI de hCG. Para isso, foram utilizadas fêmeas bovinas das raças Jersey e Holandês (n=7), não gestantes e não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 4 (1-5). Os animais tiveram o seu ciclo estral controlado a partir de um protocolo hormonal baseado na introdução de um dispositivo intravaginal (DIV) contendo progesterona (P4) (Primer®, Agener União) no D0, que permaneceu durante sete dias, juntamente com a aplicação intramuscular (i.m) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE/RIC-BE®, Agener União). No D7, os DIVs foram removidos e se procedeu com a aplicação i.m de 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG- Sincro eCG®, Ourofino Saúde Animal) e de 500 µg de prostaglandina F2α (PGF) (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União). No D10, foi realizada a mensuração do diâmetro folicular por ultrassonografia modo B, os animais com folículos de diâmetro superior a 11 mm (n=5) receberam uma administração de 1000 UI de hCG por via i.m (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e foram submetidos a coleta de sangue dos vasos coccígeos 0 h (D0), 24 h (D1), 96 h (D4) e 168 h (D7) em relação ao momento da aplicação do hormônio por via i.m. As dosagens séricas de β-hCG foram realizadas pelo método de quimiluminescência utilizando o kit Helecsys HCG-β (COBAS; Roche Diagnostics), com sensibilidade de < 0.6 mIU/mL.

2.2 Experimento 2- Efeito do GnRH + hCG *versus* GnRH sobre a função luteal e características estruturais do CL

O objetivo foi avaliar o efeito da associação de dois indutores de ovulação, hCG + GnRH, *versus* o uso de GnRH de forma isolada, sobre a síntese de progesterona e características do CL como: perfusão sanguínea, diâmetro, área e circunferência. Vacas cíclicas, não gestantes e não lactantes (n=13), das raças Jersey e Holandês, com ECC entre 2,5 e 4 (1-5) foram submetidas a um protocolo hormonal, para a indução de uma nova onda de crescimento folicular, baseado na introdução de DIV contendo 1 g de P4 (Primer®, Agener União), mantido durante nove dias, juntamente com a aplicação i.m de 2 mg de BE (RIC-BE®, Agener União) no D0. A partir do D7, os folículos foram acompanhados diariamente por ultrassonografia transretal, para identificação dos folículos dominantes em crescimento. No D8, foi realizada a aplicação i.m de 500 µg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União) e no D9, foram removidos os DIVs. Após 24 h da remoção dos DIVs foi aplicado 10 µg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal), por via i.m, em todos os animais com folículos com diâmetro ≥ 11 mm.

A partir deste momento, os animais foram distribuídos, de acordo com o diâmetro folicular, igualmente equilibrado entre os dois grupos: GnRH (n=5), sem nenhum tratamento adicional; e GnRH + hCG (n=5), que recebeu uma aplicação de 1000 UI de hCG (Chorulon®, MSD Saúde Animal) 16 h após o GnRH. Os animais foram acompanhados por ultrassonografia transretal a cada 12 h para verificar a ocorrência da ovulação, que foi considerada como a ausência do folículo pré-ovulatório previamente identificado. Nos dias cinco (D5) e sete (D7) após o GnRH os animais foram avaliados por ultrassonografia para verificar a presença de um corpo lúteo (CL), onde anteriormente estava situado o folículo pré-ovulatório. Todos as fêmeas foram submetidas à coleta de sangue a partir dos vasos coccígeos, o sangue foi centrifugado e o soro armazenado. As dosagens de P4 foram realizadas pelo método de quimiluminescência (ADVIA Centaur Systems Progesterone Kit; Siemens; Ref. 01586287; sensibilidade de 0,21 ng/mL), com coeficientes de variação intra- e inter-ensaio inferiores a 10%.

Nos mesmos dias das coletas de sangue o CL também foi examinado por ultrassonografia Doppler colorido para avaliação da vascularização do CL classificada de forma subjetiva nos escores de 0 (ausente) a 4 (máxima), conforme [15]. Além disso, foram gravados vídeos de curta duração (7 segundos) em modo B e modo fluxo em cores, para mensuração objetiva do diâmetro, área e circunferência dos CLs. A área lútea foi medida usando uma imagem estática em modo B e a função de rastreamento. Para corpos lúteos com uma cavidade no seu interior, a área lútea foi obtida subtraindo-se a área da cavidade da área total do CL. A circunferência do CL foi calculada por meio de compassos internos do equipamento de ultrassom.

2.3 Experimento 3- Efeito da hCG sobre a função luteal e características estruturais do CL

Com o objetivo de avaliar o efeito da hCG isoladamente, como indutor de ovulação, sobre a função luteal (síntese de progesterona), características morfológicas (diâmetro, área e circunferência) e sobre a perfusão sanguínea do CL. Vacas das raças Jersey e Holandês (n=23), cíclicas, não gestantes e não lactantes, com ECC entre 2,5 e 4,5 (1-5), foram submetidas a um protocolo hormonal com uso de um DIV contendo 1 g de progesterona (Primer®, Agener União) associado a administração intramuscular de 2 mg de BE (RIC-BE®, Agener União) e 10 μg de acetato de buserelina (Sincroforte®) no dia zero (D0). Os DIVs foram removidos no D8 com simultânea aplicação de 500 μg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União). No D10, os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal para mensuração do diâmetro do folículo dominante e todas as vacas que possuíam um folículo de diâmetro superior à 10 mm foram alocadas em dois grupos, de acordo com o diâmetro folicular (igualmente equilibrado entre os dois grupos): grupo hCG (n=9), que recebeu 1000 UI de hCG por via i.m (Chorulon®, MSD Saúde Animal); grupo GnRH (n=9), que recebeu uma administração i.m de 10 μg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal).

Todos os animais passaram por avaliação ultrassonográfica para identificação da presença de CL no ovário onde estava localizado o folículo dominante nos dias cinco (D5) e dia 12 (D12), quando também foi classificada de forma subjetiva a perfusão sanguínea do CL com uso de ultrassonografia Doppler colorido (0-4) e gravados vídeos de curta duração para mensuração objetiva do diâmetro, área e circunferência dos CLs, conforme realizado no experimento 2. No D5 e D12, após administração dos indutores de ovulação, também foi realizada a coleta de sangue a partir dos vasos coccígeos, as amostras de soro obtidas foram encaminhadas para a dosagem de progesterona por quimiluminescência, conforme descrito anteriormente.

2.4 Experimento 4- Efeito da hCG sobre as concentrações dos hormônios esteroides (estradiol e progesterona) intrafoliculares

Para mensurar a ação da hCG sobre as concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona, vacas da raça Jersey (n=14), cíclicas, não gestantes e não lactantes, com ECC entre 3 e 4,5 (1-5) foram submetidas a um protocolo hormonal de controle do ciclo estral, com a administração de um DIV contendo 1g de P4 (Primer®, Agener União) concomitante com a administração i.m de 2 mg de BE (RIC-BE®, Agener União). No D8, os DIVs foram removidos e foi realizada a aplicação i.m de 500 μg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União). No D10, os animais tiveram o diâmetro do folículo dominante avaliado por ultrassonografia, e as vacas com folículo superior a 10 mm de diâmetro, foram distribuídas de forma equilibrada entre os grupos: hCG (n=7), que recebeu 1000 UI de hCG por via i.m (Chorulon®, MSD Saúde Animal); ou GnRH (n=6), no qual as fêmeas receberam, por via i.m, 10 μg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal).

No D11, 24 h após administração do indutor de ovulação, os animais foram avaliados novamente por ultrassonografia para verificar a presença do folículo pré-ovulatório

anteriormente examinado e as fêmeas que ainda não tinham ovulado (grupo hCG 6/7 e grupo GnRH 3/6) passaram por aspiração do maior folículo presente nos ovários, após higienização da região do períneo e vulva e anestesia epidural com lidocaína. O fluído folicular foi armazenado em micro tubos, congelado a -20 ºC e posteriormente destinado a um laboratório comercial para a dosagem de estradiol e progesterona.

2.5 Análise estatística

Dados contínuos foram analisados quanto à distribuição e normalizados quando necessário. Análises pareadas foram realizadas com o teste T de Student incluindo a vaca no modelo. Dados de diâmetro folicular, concentrações de estradiol e progesterona no fluído folicular foram comparadas por análise de variância, utilizando um nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Experimento 1

A maior concentração sérica de β-hCG (Fig. 1) foi observada 24 h após a administração de hCG por via intramuscular. Observou-se uma redução da β-hCG sérica até o quarto dia (96 h), sendo que no dia sete após hCG a concentração em todos os animais era inferior a 0,2 mUI/mL (limite inferior do ensaio).

3.2 Experimento 2

A administração de GnRH+hCG não afetou as características estruturais do CL como vascularização, diâmetro, área e circunferência. Porém, em relação a concentração sérica de progesterona foi observado que vacas tratadas com GnRH+hCG apresentaram maior concentração de P4 sete dias após o tratamento com GnRH (Fig. 2; $P < 0,05$).

3.3 Experimento 3

Em relação às características do CL, foi observado maior diâmetro (Fig. 3), área (Fig. 4) e circunferência (Fig. 5) do corpo lúteo em animais tratados com hCG quando comparados ao grupo GnRH ($P < 0,05$).

A concentração sérica de progesterona (Fig. 6) não foi afetada pela administração de hCG de forma isolada, não havendo diferença significativa entre os grupos GnRH e hCG ($P > 0,05$).

3.4 Experimento 4

A administração de hCG não afetou as concentrações intrafoliculares (Fig. 7) de estradiol e progesterona 24 h após a sua administração. Os grupos GnRH e hCG não diferiram significativamente quanto a concentração desses hormônios esteroides ($P > 0,05$).

4. Discussão

No presente estudo, foram dosadas as concentrações de β-hCG ao longo do tempo após indução da ovulação com 1000 UI de hCG, sendo observado um pico de concentração às 24 h após o tratamento e foi possível demonstrar que uma semana após a administração as concentrações de β-hCG são semelhantes a hora zero (0 h). Schmitt et al. [2] relataram um pico na concentração de hCG próximo às 10 h após o tratamento com 3000 UI de hCG em novilhas (1000 UI por via intravenosa e 2000 UI por via intramuscular), essas concentrações diminuíram e apresentaram uma nova elevação por volta das 30 h após a administração, além disso as concentrações de hCG permaneceram superiores aos níveis basais e em relação ao grupo controle até 66h após o tratamento. Ainda, Nascimento et al. [8] dosaram o perfil de hCG circulante, em vacas leiteiras, entre 0 e 168 h após a administração de 3300 UI de hCG, onde foi observado maiores concentrações entre 4 e 12 h após o tratamento, seguido pela redução a partir de 24 h atingindo concentrações basais, que não diferiram da hora zero, em 72 h após o tratamento. As concentrações máximas de hCG observadas no presente estudo foram inferiores

em comparação aos dados da literatura, o que se deve às diferenças nas doses utilizadas e momentos de avaliação.

Em um segundo momento, avaliou-se o efeito da hCG, associada ou não ao GnRH, sobre a síntese de progesterona e características do corpo lúteo. Foi possível observar incremento na concentração sérica de P4 de animais tratados com a combinação de dois indutores de ovulação (GnRH + hCG). Tal achado pode ser justificado pela ação luteotrófica da hCG, aumentando o número de células lúteas grandes, principais responsáveis pela produção de progesterona [16–18]. Entretanto, não foi observado efeito positivo de tal associação sobre as características estruturais e sobre a perfusão sanguínea do CL. O aumento de P4 sem alterações estruturais do CL pode ser decorrente do fato de que, em ambos os grupos, a luteinização e ovulação foram induzidas com GnRH. Ou seja, a administração de hCG pode ter afetado apenas a função celular, estimulando enzimas esteroidogênicas, sem modificações detectáveis na estrutura, embora essa hipótese ainda tenha que ser testada.

Em um estudo do nosso grupo utilizando vacas imunocastradas foi possível observar um longo efeito da hCG sobre a função luteal [19]. As vacas (n=6), apresentando apenas folículos com diâmetro inferior a 3 mm e ausência de CL, receberam implante intravaginal (1g de P4; D0) e foram tratadas com 830 UI de eCG em D2 e D4, para promover o crescimento folicular. No D6,5, os implantes foram removidos e foram administradas 1250 UI de hCG. Vacas que responderam aos tratamentos (4/6) ovularam e apresentaram concentração de P4 acima de 20 ng/mL no D14, ou seja, cerca de sete dias após o tratamento com hCG. O fato das vacas imunocastradas teoricamente não possuírem LH circulante sugere que uma aplicação de hCG pode estimular a função luteal por longo período.

Contudo, o tratamento com hCG como indutor de ovulação de forma isolada não afetou as concentrações de P4 sérica e a perfusão sanguínea do CL, assim como a taxa de prenhez, porém refletiu em corpos lúteos com maior diâmetro, área e circunferência, possivelmente reflexo do efeito luteotrófico. Este efeito da hCG sobre o tamanho do corpo lúteo (área lútea primária, diâmetro e área lútea total) já foi descrito anteriormente, quando utilizado cinco dias após a ovulação [10]. Em outro estudo, Maillo et al. [20] demonstraram que o tratamento com hCG 24h após o início do estro não teve efeito sobre a área do CL, entretanto uma única injeção intramuscular de 3000 UI de hCG 48 h após o estro ou 72 h após o início do estro aumentou a área do CL do dia seis ao doze e do dia nove ao doze, respectivamente. Consistente com os efeitos no corpo lúteo, a administração de hCG no dia 2 aumentou significativamente a concentração de P4 circulante, em comparação com o controle, do dia seis ao onze, diferente do que foi encontrado neste estudo.

Em relação as concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona 24 h após os tratamentos, não foram observadas diferenças entre os grupos. No entanto, apenas uma das fêmeas do grupo hCG ovulou até 24 h após o tratamento, enquanto no grupo GnRH três das seis vacas ovularam até 24h após a aplicação do indutor, o que poderia sugerir que as ovulações induzidas por hCG ocorrem mais tardiamente em relação ao GnRH. Liu et al. [21] compararam o momento da ovulação utilizando os indutores, GnRH (250 μg de gonadorelina) ou hCG (3000 UI), no início do diestro (5,5 a 6,5 dias após a ovulação) e meio do diestro (9 a 10 dias após a ovulação) em vacas leiteiras em lactação. Os autores demonstraram que a ovulação dos animais que receberam GnRH ocorre 30,0 ± 1,0 h e 28,8 ± 0,4 h, nos grupos meio e início do diestro, respectivamente. Já as vacas que receberam hCG ovularam 35,8 ± 4,6 h e 32,8 ± 2,2 h, para metade e início do diestro, respectivamente. Ainda que os autores afirmem que as ovulações induzidas por hCG são mais tardias, não houve diferença estatística entre os indutores quando comparados na mesma fase do ciclo estral.

Embora nossos achados não confirmem a hipótese de que a hCG seria capaz de melhorar a capacidade esteroidogênica do corpo lúteo, resultar em CLs maiores e com maior perfusão sanguínea, cabe ressaltar que utilizamos uma dose inferior (1000 UI) a utilizada na maioria dos

estudos descritos na literatura e até mesmo inferior a recomendada pelo fabricante. Nosso objetivo era testar uma dose economicamente viável para aplicação prática em protocolos hormonais de TETF, ou ainda em categorias específicas, que necessitam de um suporte para garantir maiores concentrações de progesterona, que sejam compatíveis com o reconhecimento e manutenção da gestação.

5. Conclusão

Com base nos achados deste estudo, utilizando vacas cíclicas e 1000 UI de hCG como indutor de ovulação, é possível concluir que as concentrações séricas de β-hCG atingiram um pico de concentração dentro de 24 h e no sétimo dia retornaram ao nível basal. A administração de hCG combinada ao GnRH elevou as concentrações séricas de progesterona e, quando utilizada como indutor de ovulação de forma isolada, a hCG refletiu em maior diâmetro, área e circunferência do CL, sem incremento na síntese de progesterona. Ainda, o processo de luteinização não diferiu entre vacas que tiveram a ovulação induzida com hCG ou GnRH. Novas pesquisas devem ser conduzidas para investigar a ação da hCG nesta dose em vacas com deficiência em gonadotrofinas.

6. Agradecimentos

PBDG recebeu financiamento da FAPERGS (#22/2551-0000391-5). BGG recebeu financiamento do CNPq (#310932/2021-1) e FAPERGS (#21/2551-0002278-7). FPM recebeu financiamento da Capes (Código de financiamento 001).

7. Declaração de conflito de interesse

Não há nenhum conflito de interesse a declarar.

8. Contribuição dos autores

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

9. Referências

[1] Smitz J, Platteau P. Influence of human chorionic gonadotrophin during ovarian stimulation: an overview. Reprod Biol Endocrinol 2020; 6;18(1):80. doi: 10.1186/s12958-020-00639-3.

[2] Schmitt J, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, et al. Differential Response of the Luteal Phase and Fertility in Cattle Following Ovulation of the First-Wave Follicle with Human Chorionic Gonadotropin or an Agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone. J Anim Sci 1996; 74(5):1074-83. doi: 10.2527/1996.7451074x.

[3] Cunha TO, Martins JPN. Graduate Student Literature Review: Effects of human chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and fertility in cattle. J Dairy Sci 2022; 105:8401–10. https://doi.org/10.3168/JDS.2022-21991.

[4] de Rensis F, López-Gatius F, García-Ispierto I, Techakumpu M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. Theriogenology 2010; 73:1001–8. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2009.11.027.

[5] Cunha TO, Martinez W, Walleser E, Martins JPN. Effects of GnRH and hCG administration during early luteal phase on estrous cycle length, expression of estrus and fertility in lactating dairy cows. Theriogenology 2021; 173:23–31. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2021.06.010.

[6] Rossignolo EA de A, Silva NC da, Stolf RL, Cavalieri FLB, Colombo AHB, Andreazzi MA, et al. Evaluation of hCG as gonadotropic support to timed embryo transfer protocol in beef cattle. Theriogenology 2023; 195:24–30. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2022.10.004.

[7] Burns MG, Buttrey BS, Dobbins CA, Martel CA, Olson KC, Lamb GC, et al. Evaluation of human chorionic gonadotropin as a replacement for gonadotropin-releasing hormone in ovulation-synchronization protocols before fixed timed artificial insemination in beef cattle. J Anim Sci 2008; 86:2539–48. https://doi.org/10.2527/JAS.2008-1122.

[8] Nascimento AB, Bender RW, Souza AH, Ayres H, Araujo RR, Guenther JN, et al. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. J Dairy Sci 2013; 96:2873–82. https://doi.org/10.3168/JDS.2012-5895.

[9] Garcia-Ispierto I, Llobera-Balcells M, López-Gatius F. Inducing ovulation with human chorionic gonadotrophin improves the pregnancy rate in lactating dairy cows receiving an in vitro-produced embryo. Reprod Domest Anim 2021; 56:1145–7. https://doi.org/10.1111/RDA.13971.

[10] Garcia-Ispierto I, de Rensis F, Casas X, Caballero F, Mur-Novales R, López-Gatius F. Reproductive performance of lactating dairy cows after inducing ovulation using hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol. Theriogenology 2018; 107:175–9. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2017.11.012.

[11] Agarwal S, Gupta HP, Prasad S, Verma PK, Khanam A, Khan FA. Effect of various hCG treatment protocols on luteal characteristics, plasma progesterone concentration, and pregnancy in normal cyclic Indian crossbred dairy cows. Trop Anim Health Prod 2021; 53:1–7. https://doi.org/10.1007/S11250-021-02665-8/figures/7.

[12] Garcia-Ispierto I, de Rensis F, Casas X, Caballero F, Serrano-Pérez B, López-Gatius F. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under heat stress conditions. Theriogenology 2019; 124:65–8. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2018.10.015.

[13] Beindorff N, Honnens A, Penno Y, Paul V, Bollwein H. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. Theriogenology 2009; 72:528–34. https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2009.04.008.

[14] Marthold D, Detterer J, Koenig von Borstel U, Gauly M, Holtz W. Fixed-time Insemination in Pasture-based Medium-sized Dairy Operations of Northern Germany and an Attempt to Replace GnRH by hCG. Reprod Domest Anim 2016; 51:85–90. https://doi.org/10.1111/RDA.12649.

[15] Pugliesi G, Rezende Germano R, Barboza Da Silva JC, Lopes E, Nishimura Kan T, Baruselli PS, et al. Uso da ultrassonografia em programas de IATF e TETF em bovinos. Rev Bras Reprod Anim 2017; 41:140–50.

[16] Farin CE, Moeller CL, Mayan H, Gamboni F, Sawyer HR, Niswender2 GD. Effect of Luteinizing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin on Cell Populations in the Ovine Corpus Luteum. Biol Reprod 1988; 38:413–21. doi: 10.1095/biolreprod38.2.413.

[17] Schmitt J, Barros CM, Fields PA, Fields MJ, Diaz T, Kluge JM, et al. A Cellular and Endocrine Characterization of the Original and Induced Corpus Luteum After Administration of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist or Human Chorionic

Gonadotropin on Day Five of the Estrous Cycle. J Anim Sci 1996; 74(8):1915-29. doi: 10.2527/1996.7481915x.

[18] Salles MGF, Araújo AA. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão Cyclic and gestational corpus luteum: review. Rev Bras Reprod Anim 2010; 34 (3): 185-194.

[19] Méa R della, Gasperin BG, Gonçalves PBD. Imunização anti-GnRH como um modelo para estudo da suplementação exógena de gonadotrofinas em fêmeas bovinas. Universidade Federal de Santa Maria, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/22700/DIS_PPGMV_2021_DELLA%20MEA_RICARDO.pdf?sequence=1. Acesso em: 15 fev 2022.

[20] Maillo V, Duffy P, O'Hara L, de Frutos C, Kelly AK, Lonergan P, et al. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. Reprod Fertil Dev 2014; 26:367–74. https://doi.org/10.1071/RD12353.

[21] Liu TC, Ho CT, Li KP, Chang CC, Chan JPW. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. J Reprod Dev 2019; 65:507–14. https://doi.org/10.1262/JRD.2019-037.

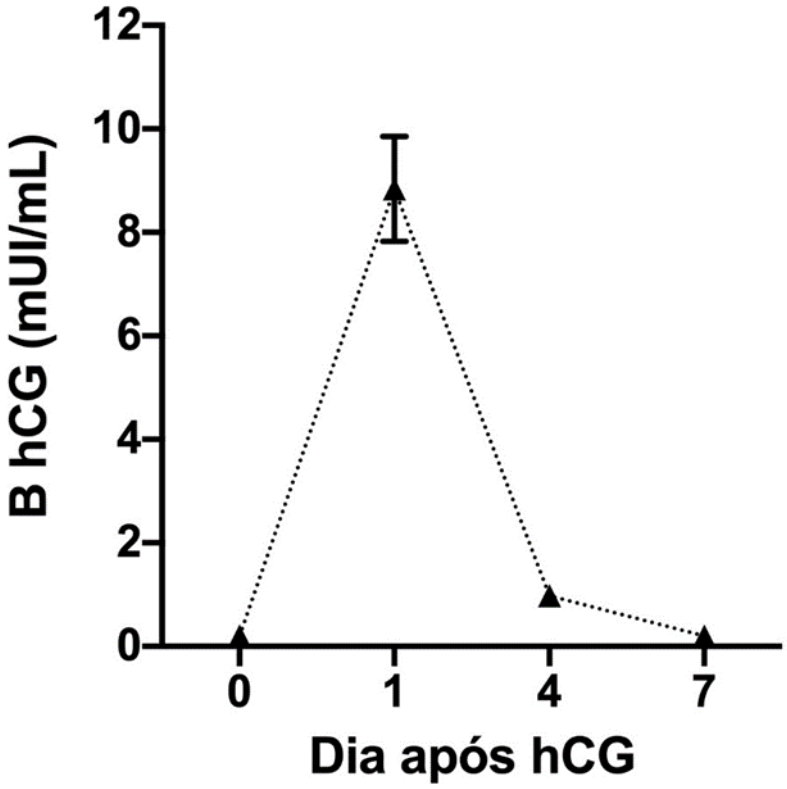

Figura 1- Concentração sérica de β-hCG (mUI/mL) 0 h (dia 0), 24 h (dia 1), 96 h (dia 4) e 168 h (dia 7) após a aplicação de 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por via intramuscular.

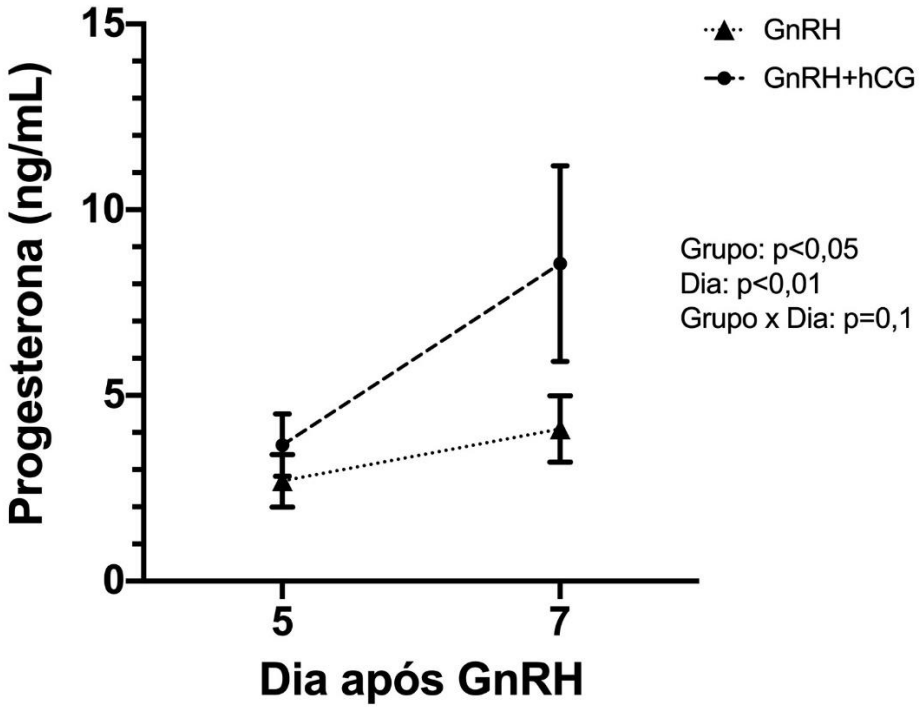

Figura 2- Concentração de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 5 e 7 após a aplicação dos tratamentos nos seguintes grupos: GnRH (n=5), recebeu a aplicação de um análogo ao GnRH (10 µg de acetato de buserelina) como indutor de ovulação 24 h após a remoção dos dispositivos intravaginais (DIVs) contendo progesterona; e GnRH + hCG (n=5), que além a administração do análogo ao GnRH 24 h após a remoção dos DIVs, também recebeu uma aplicação de 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) 16 h após o GnRH. GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas.

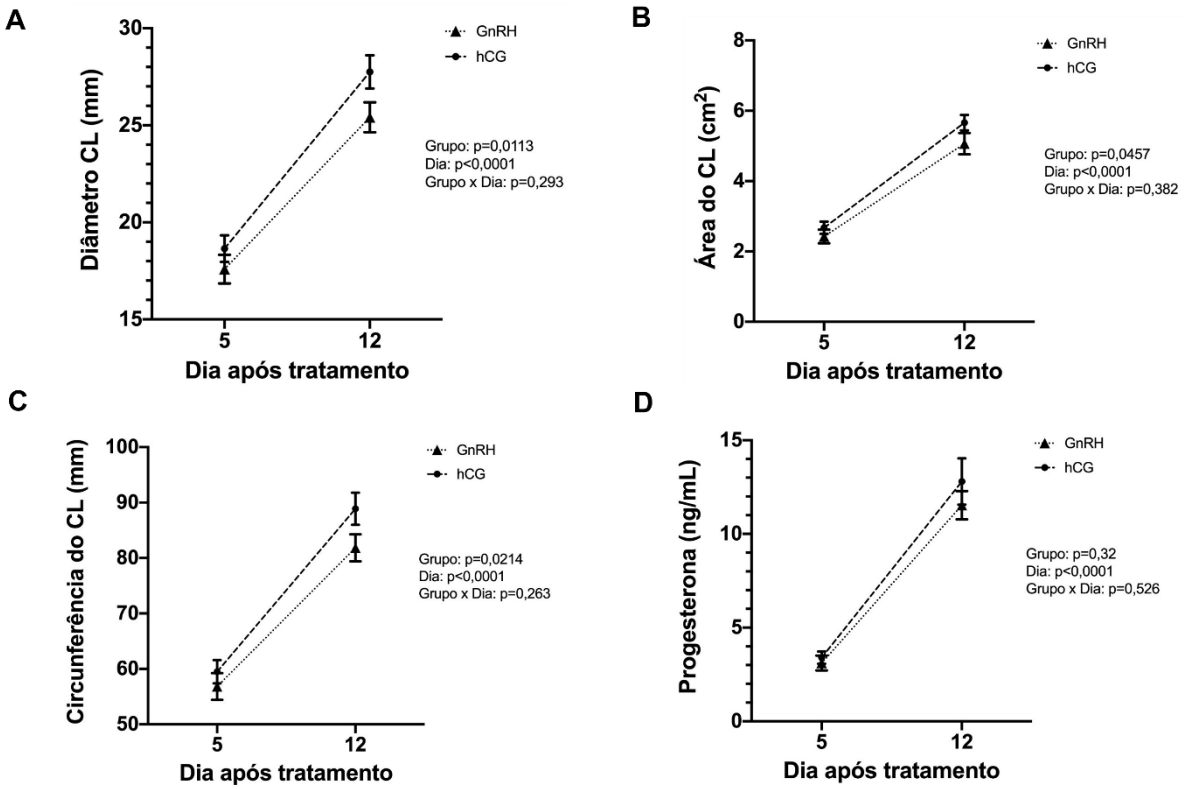

Figura 3- Diâmetro (A), área (B), circunferência (C) do corpo lúteo (CL) (mm) e concentração de progesterona sérica nos dias 5 e 12 após os tratamentos para os seguintes grupos: GnRH (n=9), que recebeu como indutor de ovulação 10 µg de acetato de buserelina (análogo ao GnRH); e hCG (n=9), no qual foi administrado 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor de ovulação. GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas.

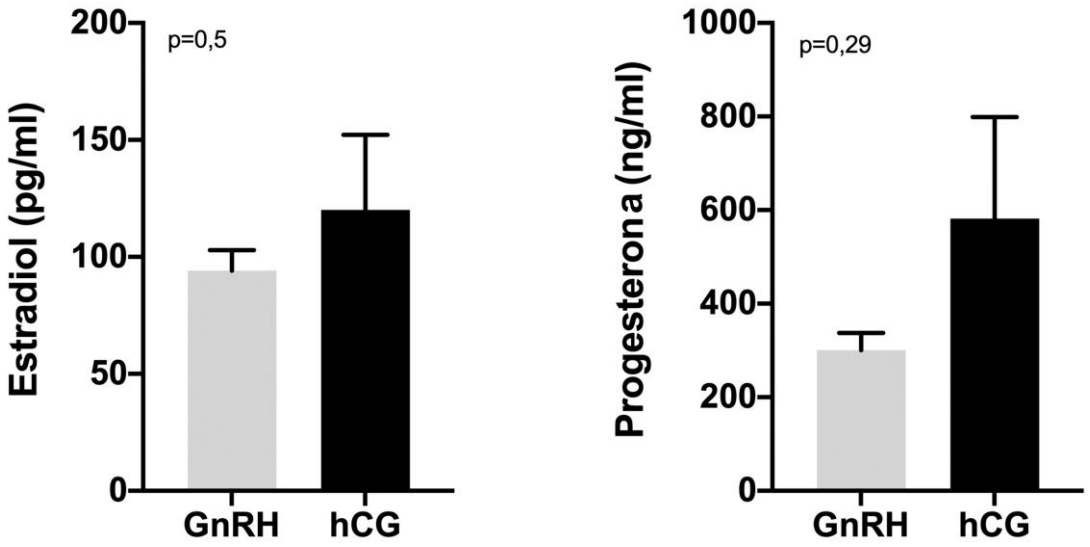

Figura 4- Concentração intrafolicular de estradiol (A) e progesterona (B) 24 h após a administração dos tratamentos nos seguintes grupos: GnRH (n=3), recebeu como indutor de ovulação 10 µg de acetato de buserelina (análogo ao GnRH); hCG (n=6), no qual foi administrado 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor de ovulação. GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas.

3 Considerações Finais

O entendimento sobre como os fatores produzidos localmente atuam na foliculogênese antral, ovulação e luteinização é mais recente e não está completamente elucidado. Neste sentido, diversos estudos do nosso grupo, juntamente com dados obtidos na literatura, demonstraram que os membros da família TGF-β, especialmente BMP15 e GDF9, são fundamentais na regulação da diferenciação folicular, determinação da taxa ovulatória e ocorrência da ovulação.

Em relação ao segundo estudo, a administração parenteral do AINE FM em dose terapêutica não bloqueou a ovulação induzida por GnRH, demonstrando não ser um modelo adequado para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório. Estudos futuros devem testar o uso do AINE FM por via intrafolicular e a suplementação de PGE por outra via de administração.

No terceiro estudo, o uso de hCG, em uma dose mais viável economicamente (1000 UI) em vacas cíclicas, não resultou em incremento expressivo na função luteal e características do CL. Entretanto, acredita-se que em virtude da sua ação luteotrófica e efeito mais duradouro, animais com deficiência de LH e vacas leiteiras em condições de estresse térmico possam ser beneficiadas com o uso desse hormônio. Portanto, torna-se pertinente a investigação da hCG nessas categorias.

Com base no acima exposto, a melhor compreensão da regulação local da função ovariana, seja envolvendo os membros da superfamília TGF-β, as prostaglandinas, ou indutores de ovulação que atuem localmente, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle do ciclo estral e indução de um CL de melhor qualidade.

Referências

AGARWAL, S.; GUPTA, H. P.; PRASAD, S.; VERMA, P. K.; KHANAM, A.; KHAN, F. A. Effect of various hCG treatment protocols on luteal characteristics, plasma progesterone concentration, and pregnancy in normal cyclic Indian crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2021.

AIUMLAMAI, S.; ODENSVIK, K.; STABENFELDT, G.; KINDAHL, H. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 37, n. 1, p. 16–22, 1990.

AKIYAMA, I.; YOSHINO, O.; OSUGA, Y.; SHI, J.; TAKAMURA, M.; HARADA, M.; KOGA, K.; HIROTA, Y.; HIRATA, T.; FUJII, T.; SAITO, S.; KOZUMA, S. The Role of Bone Morphogenetic Protein 6 in Accumulation and Regulation of Neutrophils in the Human Ovary. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 6, p. 772–777, 2014.

ALAM, M. H.; LEE, J.; MIYANO, T. GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 5, p. 423–431, 2018.

ALAM, M. H.; MIYANO, T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 19, n. 1, p. 13–23, 2020.

BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; PENNO, Y.; PAUL, V.; BOLLWEIN, H. Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 528–534, 2009.

BELLI, M.; SHIMASAKI, S. Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. **Vitamins and Hormones**, v.107, p. 317–348. 2018.

BERISHA, B.; RODLER, D.; SCHAMS, D.; SINOWATZ, F.; PFAFFL, M. W. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10: 467, 2019.

BURNS, M. G.; BUTTREY, B. S.; DOBBINS, C. A.; MARTEL, C. A.; OLSON, K. C.; LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S. Evaluation of human chorionic gonadotropin as a replacement for gonadotropin-releasing hormone in ovulation-synchronization protocols before fixed timed artificial insemination in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 10, p. 2539–2548, 2008.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of Bos indicus: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CRAWFORD, J. L.; MCNATTY, K. P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 339–343, 2012.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. **Animal reproduction science**, v. 127, n. 1–2, p. 84–90, 2011.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 707–714, 2011.

CUNHA, T. O.; MARTINEZ, W.; WALLESER, E.; MARTINS, J. P. N. Effects of GnRH and hCG administration during early luteal phase on estrous cycle length, expression of estrus and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 173, p. 23–31, 2021.

CUNHA, T. O.; MARTINS, J. P. N. Graduate Student Literature Review: Effects of human chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and fertility in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 10, p. 8401–8410, 2022.

DAVIS, K. A.; KLOHONATZ, K. M.; MORA, D. S. O.; TWENTER, H. M.; GRAHAM, P. E.; PINEDO, P.; ECKERY, D. C.; BRUEMMER, J. E. Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth differentiation factor-9 on ovarian function in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 69–77, 2018.

DELLA MÉA, Ricardo. **Imunização anti-GnRH como um modelo para estudo da suplementação exógena de gonadotrofinas em fêmeas bovinas**. 2021.53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/22700/DIS_PPGMV_2021_DELLA%20MEA_RICARDO.pdf?sequence=1> Acesso em: 15 fev. 2022.

DE RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; TECHAKUMPU, M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1001–1008, 2010.

DE SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 547–549, 1985.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 531–535, 1996.

DONNELLY, C. G.; SONES, J. L.; DOCKWEILER, J. C.; NORBERG, L. A.; NORBERG, L. E.; CHEONG, S. H.; GILBERT, R. O. Effects of flunixin meglumine on postponement of ovulation in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 3, p. 306–310, 2019.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of Genes Associated with Developmentally Competent Bovine Oocytes and Quantitation of Their Levels During Development1. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813–1821, 2004.

EDSON, M. A.; NALAM, R. L.; CLEMENTI, C.; FRANCO, H. L.; DEMAYO, F. J.; LYONS, K. M.; PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M. Granulosa Cell-Expressed BMPR1A and BMPR1B Have Unique Functions in Regulating Fertility but Act Redundantly to Suppress Ovarian Tumor Development. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 6, p. 1251–1266, 2010.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; MAYAN, H.; GAMBONI, F.; SAWYER, H. R.; NISWENDER2, G. D. Effect of Luteinizing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin on Cell Populations in the Ovine Corpus Luteum'. **Biology Of Reproduction**, v. 38, p. 413–421, 1988.

FONSECA, J. F.; ALVIM, G. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRAIR, V. L.; BRANDÃO, F. Z.; FACÓ, O. Reproductive features and use of an anti-inflammatory drug in estrus-induced dairy goats artificially inseminated in a standing position with cervix immobilization. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 3, p. 268–273, 2017.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P. E.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.

GARCIA-GUERRA, A.; KAMALLUDIN, M. H.; KIRKPATRICK, B. W.; WILTBANK, M. C. Trio a novel bovine high-fecundity allele: II. Hormonal profile and follicular dynamics underlying the high ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 3, p. 335–349, 2018a.

GARCIA-GUERRA, A.; WILTBANK, M. C.; BATTISTA, S. E.; KIRKPATRICK, B. W.; SARTORI, R. Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: lessons learned from multiple ovulation models. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 660–679, 2018b.

GARCIA-ISPIERTO, I.; DE RENSIS, F.; CASAS, X.; CABALLERO, F.; MUR-NOVALES, R.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive performance of lactating dairy cows after inducing ovulation using hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol. **Theriogenology**, v. 107, p. 175–179, 2018.

GARCIA-ISPIERTO, I.; DE RENSIS, F.; CASAS, X.; CABALLERO, F.; SERRANO-PÉREZ, B.; LÓPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under heat stress conditions. **Theriogenology**, v. 124, p. 65–68, 2019.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LLOBERA-BALCELLS, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with human chorionic gonadotrophin improves the pregnancy rate in lactating dairy cows receiving an in vitro-produced embryo. **Reproduction in domestic animals**, v. 56, n. 8, p. 1145–1147, 2021.

GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R.; BURATINI, J.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, P. B. D. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3–4, p. 72–78, 2014.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v. 127, n. 2, p. 239–254, 2004.

GLISTER, C.; RICHARDS, S. L.; KNIGHT, P. G. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) -4, -6, and -7 Potently Suppress Basal and Luteinizing Hormone-Induced Androgen Production by Bovine Theca Interna Cells in Primary Culture: Could Ovarian Hyperandrogenic Dysfunction Be Caused by a Defect in Thecal BMP Signaling? **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1883–1892, 2005.

GLISTER, C.; SATCHELL, L.; KNIGHT, P. G. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 699–712, 2010.

HAAS, C. S.; OLIVEIRA, F. C.; ROVANI, M. T.; FERST, J. G.; VARGAS JR, S. F.; VIEIRA, A. D.; MONDADORI, R. G.; PEGORARO, L. M. C.; GONÇALVES, P. B. D.; BORDIGNON, V.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G. Bone morphogenetic protein 15 intrafollicular injection inhibits ovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 182, p. 148–154, 2022.

HAAS, C. S.; ROVANI, M. T.; OLIVEIRA, F. C.; VIEIRA, A. D.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G. Expression of growth and differentiation Factor 9 and cognate receptors during final follicular growth in cattle. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 756–761, 2016.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovis aries)1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900–909, 2004.

HOYOS-MARULANDA, V.; HAAS, C. S.; GOULARTE, K. L.; ROVANI, M. T.; MONDADORI, R. G.; VIEIRA, A. D.; GASPERIN, B. G.; LUCIA, T. Expression of steroidogenic enzymes and TGFβ superfamily members in follicular cells of prepubertal gilts with distinct endocrine profiles. **Zygote**, v. 30, n. 1, p. 65–71, 2022.

HUANG, Z.; WELLS, D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 16, n. 10, p. 715–725, 2010.

ILHA, G.; ROVANI, M.; GASPERIN, B.; FERREIRA, R.; DE MACEDO, M.; NETO, O.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. Regulation of Anti-Müllerian Hormone and Its Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 188–194, 2016.

JAYAWARDANA, B. C.; SHIMIZU, T.; NISHIMOTO, H.; KANEKO, E.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 545–553, 2006.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; BERG, M.; HAMEL, K.; SMITH, P.; LAWRENCE, S. B.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 107–114, 2009.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of Immunization Against Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 on Ovulation Rate, Fertilization, and Pregnancy in Ewes1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 557–561, 2004.

JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; TISDALL, D. J.; SMITH, P.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Gene Expression in Abnormal Ovarian Structures of Ewes Homozygous for the Inverdale Prolificacy Gene1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1467–1478, 2000.

JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; BIBBY, A. H.; LUN, S.; ROSS, I.; HAYDON, L. J.; MCNATTY, K. P. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 501–513, 2006.

KATHIRVEL, M.; SOUNDIAN, E.; KUMANAN, V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during in vitro maturation of buffalo (Bubalus bubalis) cumulus–oocyte complexes. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 206, 2013.

KAYANI, A. R.; GLISTER, C.; KNIGHT, P. G. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. **Reproduction**, v. 137, n. 1, p. 67–78, 2009.

LANE, E. A.; AUSTIN, E. J.; CROWE, M. A. Oestrous synchronisation in cattleCurrent options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1, p.1-16, 2008.

LEONARDI, C. E. P.; PFEIFER, L. F. M.; RUBIN, M. I. B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R. J.; PESSOA, G. A.; BAINY, A. M.; SILVA, C. A. M. Prostaglandin F2α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1578–1582, 2012.

LI, Y.; LI, R.-Q.; OU, S.-B.; ZHANG, N.-F.; REN, L.; WEI, L.-N.; ZHANG, Q.-X.; YANG, D.-Z. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 81, 2014.

LIU, T. C.; HO, C. T.; LI, K. P.; CHANG, C. C.; CHAN, J. P. W. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 6, p. 507–514, 2019.

MAILLO, V.; DUFFY, P.; O'HARA, L.; DE FRUTOS, C.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 3, p. 367–374, 2014.

MARTHOLD, D.; DETTERER, J.; KOENIG VON BORSTEL, U.; GAULY, M.; HOLTZ, W. Fixed-time Insemination in Pasture-based Medium-sized Dairy Operations of Northern Germany and an Attempt to Replace GnRH by hCG. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 85–90, 2016.

MATSUI, M.; SONNTAG, B.; HWANG, S. S.; BYERLY, T.; HOURVITZ, A.; ADASHI, E. Y.; SHIMASAKI, S.; ERICKSON, G. F. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Production in Rat Granulosa Cells: Stimulation by Follicle-Stimulating Hormone and Inhibition by the Oocyte-Derived Bone Morphogenetic Protein-15. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3686–3695, 2004.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; LUN, S.; JUENGEL, J. L.; MOORE, L. G. Gonadotrophin-responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant sheep. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 545–551, 2009.

MCNATTY, K. P.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; READER, K. L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; JUENGEL, J. L. The Effects of Immunizing Sheep with Different BMP15 or GDF9 Peptide Sequences on Ovarian Follicular Activity and Ovulation Rate1. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, p. 552–560, 2007.

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 481–487, 2005.

MCNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.;

RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 379–386, 2004.

MURDOCH, W. J.; DUNN, T. G. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. **Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 671–675,1983.

NASCIMENTO, A. B.; BENDER, R. W.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; ARAUJO, R. R.; GUENTHER, J. N.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2873–2882, 2013.

OTSUKA, F.; MCTAVISH, K. J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 1, p. 9–21, 2011.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387–11392, 2001.

PARK, M. J.; AHN, J.-W.; KIM, K. H.; BANG, J.; KIM, S. C.; JEONG, J. Y.; CHOI, Y. E.; KIM, C.-W.; JOO, B. S. Prediction of ovarian aging using ovarian expression of BMP15, GDF9, and C-KIT. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 8, p. 711–719, 2020.

PATIÑO LC; WALTON KL; MUELLER TD; JOHNSON KE; STOCKER W; RICHANI D; AGAPIOU D; GILCHRIST RB; LAISSUE P; HARRISON CA. BMP15 Mutations Associated with Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy with GDF9. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 3, p. 1009-1019, 2017.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 2, p. 354–361, 2011.

PAULINI, F.; MELO, E. O. Effects of Growth and Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 overexpression on the steroidogenic metabolism in bovine granulosa cells in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 6, p. 837–847, 2021.

PEREIRA DE MORAES, F.; AMARAL D'AVILA, C.; CAETANO DE OLIVEIRA, F.; ÁVILA DE CASTRO, N.; DINIZ VIEIRA, A.; SCHNEIDER, A.; MACHADO PFEIFER, L. F.; CANTARELLI PEGORARO, L. M.; FERREIRA, R.; GERMANO FERST, J.; TOMAZELE ROVANI, M.; NUNES CORREA, M.; DIAS GONÇALVES, P. B.; LUCIA, T.; GARZIERA GASPERIN, B. Prostaglandin F2α regulation and function during ovulation and luteinization in cows. **Theriogenology**, v. 171, p. 30–37, 2021.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H.; RUBIN, M. I.

B. The use of PGF2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689–695, 2014.

PUGLIESI, G.; REZENDE GERMANO, R.; BARBOZA DA SILVA, J. C.; LOPES, E.; NISHIMURA KAN, T.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA HOFFMANN, E.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 140–150, 2017.

ROSSI, R. O. D. S.; COSTA, J. J. N.; SILVA, A. W. B.; SARAIVA, M. V. A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. **Zygote**, v. 24, n. 1, p. 1–17, 2016.

ROSSIGNOLO, E. A. de A.; SILVA, N. C. da; STOLF, R. L.; CAVALIERI, F. L. B.; COLOMBO, A. H. B.; ANDREAZZI, M. A.; SENEDA, M. M.; MOROTTI, F. Evaluation of hCG as gonadotropic support to timed embryo transfer protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v. 195, p. 24–30, 2023.

ROVANI, M. T.; GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 383–391, 2017.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n.3, p. 185–194, 2010.

SANFINS, A.; RODRIGUES, P.; ALBERTINI, D. F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 10, p. 1741–1750, 2018.

SCHMITT, J.; BARROS, C. M.; FIELDS, P. A.; FIELDS, M. J.; DIAZ, T.; KLUGE, J. M.; THATCHER, W. W. A Cellular and Endocrine Characterization of the Original and Induced Corpus Luteum After Administration of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist or Human Chorionic Gonadotropin on Day Five of the Estrous Cycle. **Journal Animal Science**, v.74, n.8, p.1915-1929, 1996.

SCHMITT, J.; DIAZ, T.; BARROS, C. M.; DE LA SOTA, R. L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E. W.; STAPLES, C. R.; THORNER, R.; THATCHER, W. W. Differential Response of the Luteal Phase and Fertility in Cattle Following Ovulation of the First-Wave Follicle with Human Chorionic Gonadotropin or an Agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone. **Journal Animal Science**, v.74, n.5, p.1074-1083, 1996.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685–700, 2003.

SMITZ J., PLATTEAU P. Influence of human chorionic gonadotrophin during ovarian stimulation: an overview. **Reprodutive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2020.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 2, p. 329–339, 2006.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells: Influence of Follicle Size on Responses to GDF91. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 2, p. 243–253, 2008.

VERNUNFT, A.; LAPP, R.; VIERGUTZ, T.; WEITZEL, J. M. Effects of different cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin production, steroidogenesis and ovulation of bovine preovulatory follicles. **Journal of Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 246-253, 2022.

VIANA, F. A. B. **Guia Terapêutico Veterinário**. 3ª ed. Belo Horizonte: Editora CEM, 2014, 560 p.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. v.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854–866, 2001.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Bernardo Garzieira Gasperin

Departamento de Patologia - Faculdade de Veterinária

Senhor Pesquisador:

A *CEEA* analisou a solicitação o projeto intitulado: **"Controle da ovulação em bovinos e suínos",** processo nº23110.000288/2015-65, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 0288-2015**).

Vigência do Projeto: 17/11/2015 a 20/12/2019
Espécie/Linhagem: Suínos e Bovinos/variados
Nº de animais: 740 suínos e 110 bovinos
Idade: 4 meses a 4 anos (suínos) e 2 a 8 anos (bovinos)
Sexo: Fêmeas
Origem: Granjas comerciais de suínos e Fazenda Experimental de Bovinos

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo II - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CEUA UFRGS

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41037
Título: ESTRATÉGIAS PARA MAIOR CONTROLE DA OVULAÇÃO E PREVENÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM BOVINOS

Vigência: 01/09/2021 à 30/12/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Monique Tomazele Rovani - coordenador desde 01/09/2021
GABRIELLA DOS SANTOS VELHO - desde 01/09/2021
André Gustavo Cabrera Dalto - pesquisador desde 01/09/2021

Equipe Externa:

Bernardo Garziera Gasperin - pesquisador desde 01/09/2021

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 26/07/2021 - Reunião remota via portal Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização, para experimentação, de 1.750 bovinos fêmeas oriundas de propriedade rural particular localizada em Minas do Leão/RS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 5 de Agosto de 2021

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

Anexo III - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

PARECER Nº **160/2020/CEEA/REITORIA**
PROCESSO Nº 23110.031587/2020-17

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Alternativas para o controle do ciclo estral de bovinos e ovinos."**, registrada com o nº 23110.031587/2020-17**,** sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **08 de dezembro de 2020**.

Finalidade	(x) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	01/01/2021 a 30/12/2025
Espécie/linhagem/raça	*Ovis aries* – raças comerciais e cruzas *Bos taurus* – raças comerciais e cruzas
Nº de animais	486 ovinos 688 bovinos
Idade	ovinos - 12 a 60 meses bovinos - 12 a 96 meses
Sexo	ovinos - 26 machos e 460 fêmeas bovinos - 688 fêmeas
	Propriedades particulares

Código para cadastro nº **CEEA 31587-2020**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, **Médico Veterinário**, em 16/12/2020, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1158071** e o código CRC **F7CD04A5**.