



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO PAULO MENDES LOLLATO

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FSH (PLUSET®) NO
PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO OVARIANA DE
VACAS NELORE COM ALTA E BAIXA CONTAGEM DE
FOLÍCULOS ANTRAIS**

Londrina
2021

JOÃO PAULO MENDES LOLLATO

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FSH (PLUSET®) NO
PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO OVARIANA DE
VACAS NELORE COM ALTA E BAIXA CONTAGEM DE
FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Morotti

Londrina
2021

JOÃO PAULO MENDES LOLLATO

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FSH (PLUSET®) NO
PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO OVARIANA DE
VACAS NELORE COM ALTA E BAIXA CONTAGEM DE
FOLÍCULOS ANTRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fabio Morotti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Denis Vinicius Bonato
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Londrina, ____ de _____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, pai, mãe, irmãos, esposa e filha que tanto me deram forças para poder concluir esta etapa, obrigado pelo apoio e pelas orações no tempo em que me dediquei ao meu Mestrado. Obrigado a todos.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre, nos momentos de felicidade e de angustia me mostra o caminho certo e a melhor decisão a ser tomada, por me dar forças quando tentei desistir nos momentos mais difíceis e por colocar pessoas tão especiais na minha vida.

Ao professor Dr. Fábio Morotti pela sua orientação, amizade, sabedoria, incentivo, paciência e oportunidade de conhecer e iniciar o Mestrado Profissional. A sua dedicação como orientador demonstra o que pensava desde a graduação quando o conheci, este “cara” vai ser um excelente profissional e hoje só confirmo minha impressão. Mestre, parabéns pela sua dedicação, paixão pela profissão e principalmente pelo método de compartilhar seu conhecimento.

A minha família, minha esposa Rosana pela paciência e pelo apoio quando as aulas me faziam viajar de Curitiba para Londrina, muitas vezes duas vezes na semana para poder cursar as disciplinas, obrigado, amo você muito e para sempre. A minha filha Maria Clara, que sempre me dava forças para continuar e concluir este projeto de desenvolvimento pessoal. Aos meus pais Pio e Cristina, que apoiaram incondicionalmente a minha vontade de voltar a estudar depois de 10 anos de formado e aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos que sempre apoiaram e de alguma forma me dão forças para ir além.

Aos professores da pós-graduação que sempre compartilharam o conhecimento e buscavam nos fazer pensar de “fora da caixa” e como utilizar o que aprendemos de maneira que contribua para o nosso desenvolvimento pessoal e profissional. Um agradecimento especial ao Prof. Marcelo Seneda que acreditou no desenvolvimento deste projeto, nos incentivou e apoiou para que pudesse ser concluído com sucesso.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade, informações compartilhadas, desesperos de prazos compartilhados, desejo muito sucesso a todos.

À família Biogénesis Bagó, em especial Reuel Gonçalves, Suzana Derussi e Marcelo Bulman, pela oportunidade de poder cursar a pós-graduação e pela confiança de possibilitar conciliar o trabalho com os estudos e principalmente por acreditarem no meu trabalho e que esta capacitação seria de extrema

importância para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer de forma especial algumas pessoas que contribuíram para o desenvolvimento do projeto e do artigo, Equipe Geraembryo, Rubens Cesar Pinto da Silva, Mário Ribeiro Jr. e Márcio Oliveira Marques. A residente Ana Clara pela sua dedicação durante a execução do trabalho. Agradeço também a toda equipe da Fazenda Nossa Senhora de Fátima – Nelore HoRa - Höfig Ramos pela oportunidade e gentileza em ceder animais e instalações para execução do projeto.

Agradeço todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado, desde o planejamento a sua conclusão.

A todos vocês meu Muito Obrigado!

LOLLATO, João Paulo Mendes. **Efeito de diferentes doses de FSH (Pluset®) no protocolo de superovulação ovariana de vacas nelore com alta e baixa contagem de folículos antrais.** 2021.48 fls. Dissertação (Mestrado em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, 2021.

RESUMO

A Superovulação Ovariana (SOV) contribui para o melhoramento genético bovino otimizando o potencial reprodutivo da fêmea doadora. A biotécnica possibilita, através do uso do hormônio folículo estimulante (FSH), a ocorrência de múltiplas ovulações em uma fêmea fisiologicamente monovulatória, sendo a base para a produção *in vivo* de embriões. Pesquisas com doadoras Nelore utilizaram dose de FSH variando entre 250 e 500 UI (Unidades Internacionais). Uma característica que influencia o desempenho reprodutivo da fêmea bovina é a contagem de folículos antrais (CFA), que é altamente variável entre animais, porém com alta repetibilidade no indivíduo. Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de embriões em doadoras *Bos taurus indicus* com alta e baixa CFA, submetidas a SOV usando diferentes doses de FSH. As doadoras (n = 16) foram pré-sincronizadas com protocolo baseado em estrógeno (E2) e progesterona (P4) 30 dias (D-30) antes da SOV. Após a avaliação de CFA (D-26), doadoras com baixa (n = 8; ≤ 15 folículos; média = 10 ± 0,91 folículo) e alta CFA (n = 8; ≥ 25 folículos; média = 36 ± 6,05 folículos) receberam o primeiro programa de SOV utilizando a dose de 150 UI de FSH (Baixa). Após 45 dias, foram submetidas a um segundo programa utilizando a dose de 300 UI de FSH (Alta). A estimulação ovariana foi realizada utilizando protocolo convencional em tempo fixo de superovulação com doses decrescentes de FSH aplicadas com 12 horas de intervalo e a lavagem uterina foi realizada 7 dias após a indução de ovulação. Os dados foram analisados com ANOVA e teste Tukey utilizando o modelo misto ajustado ($P \leq 0,05$). O efeito CFA foi observado apenas no número de corpos lúteos (CLs) ($10,7 \pm 1,6$ e $19,2 \pm 3,1$, $P < 0,01$) em doadoras com baixa CFA e alta CFA, respectivamente. Os resultados para dose de FSH ($P < 0,05$) foram observados no número de CLs ($9,4 \pm 2,3$ e $20,5 \pm 2,4$), total de estruturas por colheita, $6,2 \pm 1,7$ e $12,2 \pm 1,9$ e número de embriões congeláveis, $3,0 \pm 0,9$ e $7,8 \pm 1,3$ considerando as doses 150 UI e 300 UI respectivamente. Uma interação significativa ($P < 0,05$) foi observada entre CFA e dose de FSH, mostrando que doadoras com alta CFA tratadas com dose alta de FSH apresentam média maior no número de CLs ($P = 0,001$), total de estruturas ($P = 0,02$), embriões viáveis ($P = 0,03$) e embriões congeláveis ($P < 0,01$). Contudo, doadoras com baixa CFA tratadas com 300 UI de FSH exibiram resposta superovulatória e produção de embriões similares as de alta CFA tratadas com 300 UI de FSH ($P > 0,01$). A produção de embriões não foi influenciada pela CFA, mas sim pela dose de FSH. Além disso, a interação significativa entre CFA e dose de FSH revelou que doadoras de alta CFA superovulada com a maior dose de FSH apresentam melhor performance em termos de produção de embriões.

Palavras-chave: Contagem de Folículos Antrais. Hormônio Folículo Estimulante. Reprodução assistida. Produção de embriões *in vivo*. Biotecnologia da reprodução.

LOLLATO, João Paulo Mendes. **Effect off different FSH doses (Pluset™) in ovarian superovulated protocol in high and low Nellore Cows antral follicle counts.** 2021. 48 fls. Dissertation (Master in Veterinary Clinics) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Ovarian Superovulation (SOV) contributes to bovine genetic improvement, optimizing the reproductive potential of the donor female. The biotechnique enables, with follicle-stimulating hormone (FSH), the occurrence of multiple ovulations in a physiologically monovulatory female, being the basis for the *in vivo* production of embryos. Research with Nellore donors used FSH doses ranging between 250 and 500 IU (International Units). A characteristic that influences the reproductive performance of the female bovine is the antral follicle count (AFC), which is highly variable among animals, but with high repeatability in the individual. This study aimed to evaluate the production of embryos in *Bos taurus indicus* donors with high and low CFA, submitted to SOV using different doses of FSH. Donors ($n = 16$) were pre-synchronized with a protocol based on estrogen (E2) and progesterone (P4) 30 days (D-30) before SOV. After evaluation of AFC (D-26), donors with low ($n = 8$; ≤ 15 follicles; mean = 10 ± 0.91 follicles) and high AFC ($n = 8$; ≥ 25 follicles; mean = $36 \pm 6, 05$ follicles) received the first SOV program using a dose of 150 IU FSH (Low). After 45 days, they were submitted to a second program using a dose of 300 IU of FSH (High). Ovarian stimulation was performed using a conventional fixed-time superovulation protocol with decreasing doses of FSH applied 12 hours apart and uterine lavage was performed 7 days after ovulation induction. Data were analyzed with ANOVA and Tukey test using the adjusted mixed model ($P \leq 0.05$). The AFC effect was observed only in the number of corpora lutea (CLs) (10.7 ± 1.6 and 19.2 ± 3.1 , $P < 0.01$) in donors with low AFC and high AFC, respectively. The results for FSH dose ($P < 0.05$) were observed in the number of CLs (9.4 ± 2.3 and 20.5 ± 2.4), total structures per harvest, 6.2 ± 1.7 and 12.2 ± 1.9 and number of frozen embryos, 3.0 ± 0.9 and 7.8 ± 1.3 considering the doses 150 IU and 300 IU respectively. A significant interaction ($P < 0.05$) was observed between AFC and FSH dose, showing that donors with high AFC treated with high FSH dose have a higher mean in the number of CLs ($P = 0.001$), total structures ($P = 0.02$), viable embryos ($P = 0.03$) and freezeable embryos ($P < 0.01$). However, low CFA donors treated with 300 IU FSH exhibited superovulatory response and embryo production similar to high AFC donors treated with 300 IU FSH ($P > 0.01$). Embryo production was not influenced by AFC but by FSH dose. Furthermore, the significant interaction between AFC and FSH dose revealed that donors with high AFC superovulated with the highest FSH dose perform better in terms of embryo production.

Key words: Antral follicle count. Follicle Stimulating Hormone. Assisted reproduction. Embryo production *in vivo*. Biotechnology of reproduction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo

Figure 1 – Experimental design, presynchronization protocol and multiple ovulation embryo transfer (MOET) program applied in Nellore (*Bos indicus*) donors with low (≤ 15 follicles) and high (≥ 25 follicles) antral follicle counts (AFCs), which received low (150 IU) and high doses (300 IU) of follicle-stimulating hormone (FSH) during the MOET protocol. In the first MOET program, a total of 150 IU of FSH (Pluset®) per donor (low and high AFC) was administered in eight decreasing doses at 12 h intervals, distributed as follows: 40% (60 IU) on Day 4 (30 IU am and 30 IU pm), 30% (45 IU) on Day 5 (22.5 IU am and 22.5 IU pm), 20% (30 IU) on Day 6 (15 IU am and 15 IU pm) and 10% (15 IU) on Day 7 (7.5 IU am and 7.5 IU pm). For the second MOET program, a total of 300 IU of FSH (Pluset®) per donor (low and high AFC) was administered in eight decreasing doses at 12 h intervals, distributed as follows: 40% (120 IU) on Day 4 (60 IU am and 60 IU pm), 30% (90 IU) on Day 5 (45 IU am and 45 IU pm), 20% (60 IU) on Day 6 (30 IU am and 30 IU pm) and 10% (30 IU) on Day 7 (15 IU am and 15 IU pm). (EB – estradiol benzoate; P4 – progesterone; PGF2 α – cloprostenol; eCG – equine chorionic gonadotrophin; EC – estradiol cypionate; GnRH – buserelin acetate; TAI – timed artificial insemination)33

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Produção de embriões bovinos no Brasil em 2017, estratificada por segmento e por tecnologia adotada (<i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>).	13
--	----

Artigo

Table 1 – Reproductive performance of Nellore donors (n = 16) with low (≤ 15 follicles, n = 8) and high (≥ 25 follicles, n = 8) antral follicle counts (AFCs) subjected to the Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) program with a low (150 IU) or high dose (300 IU) of follicle-stimulating hormone (FSH/Pluset®).....	36
--	----

Table 2 – Effect of the interaction between the antral follicle count (AFC; Low ≤ 15 follicles and High ≥ 25 follicles) and the dose of follicle-stimulating hormone (FSH; Low dose 150 IU and High dose 300 IU) on the <i>in vivo</i> embryo production performance in Nellore donors (n = 16)	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Benzoato de Estradiol
CE	Cipionato de Estradiol
CEUA-UEL	Comissão de Ética no uso de Animais
CL	Corpo Lúteo
CFA	Contagem de Folículos Antrais
E2	Estrógeno
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas.
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
LH	Hormônio Luteinizante
mg	Miligramas
MOET	Multiple ovarian and embryo transfer
OPU	Ovum Pick up
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SOV	Superovulação Ovariana
TE	Transferência de Embriões
TAI	Timed Artificial Insemination
UI	Unidades Internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ANATOMIA OVARIANA	15
2.2	FISIOLOGIA OVARIANA	15
2.3	CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (CFA)	17
2.4	SUPEROVULAÇÃO	18
2.5	RELAÇÃO ENTRE CFA E SUPEROVULAÇÃO	20
	REFERÊNCIAS	22
3	HIPÓTESE	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GERAL	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	30
	INTRODUCTION	30
	MATERIAL AND METHODS	31
	ETHICS STATEMENT	31
	LOCATION, ANIMALS AND MANAGEMENT	31
	DONOR PREPARATION, ANTRAL FOLLICLE COUNTING AND EXPERIMENTAL DESIGN	32
	MULTIPLE OVULATION PROTOCOL AND EMBRYO COLLECTION	33
	STATISTICAL ANALYSIS	34
	RESULTS	35
	DISCUSSION	38
	CONCLUSION	41
	REFERENCES	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

1 INTRODUÇÃO

A técnica de superovulação (SOV), também chamada de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET), consiste em realizar um programa de superestimulação ovariana, com posterior colheita de embriões de uma doadora, que serão transferidos para uma receptora com a finalidade de completarem o período de gestação (BARUSELLI, 2006). A transferência de embriões por superovulação (SOV) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões são ferramentas que possibilitam utilizar melhor o potencial reprodutivo de fêmeas e machos de qualidade superior, acelerando o melhoramento genético e favorecendo programas de seleção animal (NOGUEIRA, 2013). A superestimulação de doadoras bovinas tem sido amplamente estudada na tentativa de desenvolver protocolos que melhorem a produção de embriões ou que facilitem o manejo dos animais (BARROS et al., 2001; BARUSELLI et al., 2006).

A fêmea bovina é monovulatória, portanto apenas um oócito deve ser liberado de um folículo durante seu ciclo estral. O princípio da técnica de superovulação envolve o conceito de induzir a ovulação de vários folículos, e a liberação de vários oócitos, permitindo a fertilização e o desenvolvimento destas estruturas até o estágio de blastocisto. Assim, são coletados vários embriões de uma fêmea superovulada, o que permite a disseminação de sua genética de forma mais abrangente do que no caso da inseminação artificial, em que apenas um embrião é formado. Entretanto, a SOV só é alcançada através da aplicação de fármacos, que impedem o fenômeno de dominância folicular, observado na espécie bovina (BÓ et al., 2006).

A aspiração folicular transvaginal orientada por ultrassonografia (*Ovum Pick-up - OPU*) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos de doadoras vivas, em bovinos, destinados à produção *in vitro* de embriões (PIV). Esta biotécnica encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil alcançou uma posição de destaque frente ao número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica no país (STROUD e CALLESEN, 2012).

As biotécnicas de reprodução assistida crescem a cada ano, em 2016, o número de embriões *in vitro* ultrapassou o número *in vivo*, no entanto, em 2017 cresceu substancialmente, principalmente devido ao crescimento exponencial da produção *in vitro* dos Estados Unidos e Europa (VIANA, 2018).

No âmbito nacional, a participação da produção *in vivo* de embriões é visivelmente menor que a produção *in vitro*, conforme os números apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Produção de embriões bovinos no Brasil em 2017, estratificada por segmento e por tecnologia adotada (*in vivo* ou *in vitro*).

Segmento	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	Total	Varição 2016-2017
Zebuínos Leiteiros	14	12.979	12.993	12,3%
Taurinos leiteiros	22.371	167.496	189.867	-1,0%
Subtotal	22.385	180.475	202.860	-0,3%
Zebuínos de corte	1.300	96.184	97.484	5,3%
Taurinos de corte	6.290	68.869	75.159	-9,6%
Subtotal	7.590	165.053	172.643	-1,8%
Total Geral	29.975	345.528	375.503	-1,0%

Fonte: Gonçalves e Viana, 2019.

Ainda com a participação menor, a produção *in vivo* pode ser uma excelente biotecnologia a ser utilizada na pecuária tanto de leite quanto de corte. A taxa de prenhez de embriões transferidos a fresco para bovinos da raça Wagyu produzidos por SOV e fertilização *in vitro* (FIV) foram respectivamente 75% e 60% (FACIOLI, 2019).

Estudos recentes indicam que a população de folículos antrais pode ser de suma importância para melhorar desempenho reprodutivo em vacas (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017; MOROTTI et al., 2018; LIMA et al., 2020). Já existe concordância em que a contagem de folículos antrais (CFA; folículos ≥ 3 mm de diâmetro) é uma característica altamente variável entre animais, porém com alta repetibilidade no mesmo indivíduo (BURNS et al., 2005; SILVA-SANTOS et al., 2014). Assim, as fêmeas podem ser classificadas por apresentarem baixa, intermediária ou alta CFA. Apesar desta alta variabilidade entre as fêmeas, existe uma alta repetibilidade (0,85 a 0,95) da contagem folículos antrais (CFA; folículos ≥ 3 mm) no mesmo indivíduo durante as ondas de crescimento folicular (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; 2008).

Embora existam variações individuais na produção de embriões de OPU / FIV e de SOV / TE – transferência de embriões realizados nos mesmo

animais, o resultado foi um maior número de embriões de fêmeas com alta CFA (SILVA-SALTOS, 2014).

Diversos estudos avaliaram a possibilidade do controle farmacológico da ovulação, com o objetivo de viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo de fêmeas bovinas superestimuladas (ZANENGA et al., 2003; MARTINS, 2005, BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). Para otimizar o sucesso da técnica, a sincronização da emergência da onda folicular possibilita iniciar o tratamento superestimulatório em doadoras *Bos indicus* sem a necessidade de se conhecer a fase do ciclo estral.

De acordo com o encontrado em literatura, observam-se diferentes doses de FSH utilizadas para SOV, não variando apenas entre as raças e categorias, mas sim dentro de trabalhos realizados com animais das mesmas raças e nas mesmas categorias, o que dificulta uma padronização de protocolos de SOV em bovinos. Existem variações na resposta à superovulação relacionadas à dose e pureza da gonadotrofina utilizada, duração do tratamento, sensibilidade individual, idade dos animais, estresse térmico, manejo nutricional e sanitário, fase do ciclo estral da doadora, época do ano e da constituição genética da fêmea submetida ao protocolo (SANTIAGO et al., 2002; BARUSELLI et al., 2006; ALVES et al., 2009; BARROS et al., 2012).

Em matrizes da raça Nelore, Ramos et al. (2007) relatam a dose de 500 UI utilizada em vacas. Já Carvalho et al. (2013), comprovam a eficácia do tratamento em vacas Nelore, Gir e Cruzamento entre estas raças com 250 UI de FSH. Tirapelli et al. (2014) comparando dois métodos de administração do FSH também trabalharam com a dose de 250 UI por doadora. Neste contexto, é notável que há uma grande variedade no uso das doses de FSH, bem como a CFA que tem se mostrado um importante fator de influência na produção embrionária.

Até o momento nenhum estudo avaliou a relação entre diferentes doses de FSH e CFA de doadoras de embrião submetida a SOV. É possível que haja algum ajuste da dose de FSH segundo a CFA de cada doadora. Portanto, com este trabalho pretendemos auxiliar para que as doses sejam padronizadas a fim de facilitar o trabalho do profissional de campo e dos técnicos que trabalham com a técnica de SOV, além da possibilidade de obter maior quantidade de óocitos/embriões por doadora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA OVARIANA

Os ovários são órgãos pares, que se localizam até o terço ventral da cavidade abdominal, cranialmente ao púbis. Possuem formato elíptico (forma de amêndoa), tendo como tamanho cerca de 1,5 a 5 cm de comprimento e 1 a 3 cm de diâmetro, sendo esta dimensão variável mediante a fase do ciclo estral, ao qual a fêmea se encontre (KÖNIG & LIEBICH, 2011). Desempenha duas funções principais, que são interdependentes: uma endócrina e a outra exócrina ou gametogênica. Nessa última função, o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, para assegurar o crescimento e a maturação de oócitos primários ou imaturos e, finalmente, para liberar um oócito maturado no processo de ovulação (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.2 FISILOGIA OVARIANA

Ao longo do ciclo estral ocorre crescimento e atresia de um número variável de folículos, além do desenvolvimento e regressão de um corpo lúteo, com conseqüente reflexo sobre as características físicas do ovário (GINTHER, 1989; ROCHE, 1991). Nos bovinos, o desenvolvimento folicular ocorre em um padrão de ondas, sendo que cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Após este recrutamento, apenas um se desenvolve e os outros sofrem atresia folicular.

Após a divergência, e na presença de altos níveis de progesterona (P4), que promove redução da frequência na pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH), o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir de então começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989; WEBB et al., 1999). Contrariamente, o folículo dominante presente no momento da regressão luteínica culmina na ovulação (FORTUNE et al., 2004). Em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de três ondas, sendo notificada a presença de até quatro ondas de

crescimento folicular por ciclo estral (FIGUEIREDO et al., 1997). O número de folículos por onda pode chegar a $25,4 \pm 2,5$ (Carvalho, 2007), sendo que esta característica tem influência direta na eficiência da técnica de SOV / TE e de OPU / PIV (SILVA-SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

A divergência folicular é definida pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros (GINTHER et al., 1996; 2001). Gimenes et al., (2005) verificou que em novilhas da raça Nelore o período após a ovulação variou entre 2,5 e 2,7 dias. Em animais de duas ondas o tamanho do folículo dominante pode variar entre 5,4 e 6,2 mm e o diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular foi de 12,1 mm (FIGUEIREDO et al., 1997). Já em animais com três ondas de crescimento folicular os diâmetros máximos foram de 10,4; 9,4 e 11,6 mm (FIGUEIREDO et al., 1997). O corpo lúteo de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro (RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997).

A ovulação é o evento que demarca o fim da fase folicular e o início da fase luteal (HAFEZ e HAFEZ, 2000). Trata-se de um processo necessário para que se forme o CL (HAFEZ et al., 2000). O pico pré-ovulatório de LH é importante porque marca uma série de eventos bioquímicos que levam à ovulação. A ovulação envolve a destruição proposital do tecido folicular e ocorre devido ao elevado fluxo sanguíneo, colapso do tecido conectivo e contrações ovarianas (SMITH et al., 1994).

O efeito essencial do fluxo sanguíneo elevado é garantir que o folículo pré-ovulatório esteja provido com os ingredientes metabólicos e hormonais necessários para a maturação final (SMITH, 1994). Outro evento importante é o início da produção de progesterona pelo folículo dominante antes da ovulação. Após o pico de LH, as células da teca interna começam a produzir progesterona. Esta elevação local da progesterona é essencial para ovulação, sendo que o aumento do volume do fluido folicular ocorre simultaneamente. Após o pico de LH as prostaglandinas $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e $E2$ – estrógeno são sintetizadas e liberadas localmente pelo ovário (ACOSTA, et al., 1998). O papel da $PGF2\alpha$ é ajudar a remodelação do folículo em um CL após a ovulação. Após a ovulação, o CL é formado a partir das células do folículo ovulatório em um processo conhecido como luteinização, no qual essas células sofrem mudanças morfo-bioquímicas dando origem a um órgão transitório que produz progesterona (BINELLI, 2000; BÓ, 2000).

O nome de *corpus luteum* foi dado por Marcello Malpighi (1689, apud McCracken et al., 1999; Niswender et al., 2000) e sua coloração amarela na vaca é causada por altos níveis de β -caroteno, um precursor da vitamina A (GRAVES-HOAGLAND et al., 1989). O CL atinge seu tamanho máximo aproximadamente no dia 10 do ciclo (BINELLI, 2000; SENGER, 2003).

O CL contém dois tipos de células luteais esteroidogênicas que podem ser distinguidas pelo tamanho e outras características funcionais e estruturais. Tais células são denominadas células esteroidogênicas pequenas e grandes. As células pequenas possuem um diâmetro médio de 17,2 μm , são originárias das células da teca interna, secretam baixas concentrações de progesterona e são responsivas ao LH. As células esteroidogênicas grandes, as quais possuem um diâmetro médio de 38,4 μm , são originárias das células da granulosa, produzem altas quantidades de progesterona e não são responsivas à estimulação com LH (FITZ et al., 1982; ALILA e HANSEL, 1984; O'SHEA et al., 1989).

2.3 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (CFA)

A CFA pode ser determinada pela contagem de todos os folículos recrutados, maiores que 2-3 mm, através do exame ultrassonográfico dos ovários (MOROTTI et al., 2015). Além disso, sabe-se que apenas um exame ultrassonográfico, mesmo que desconhecida a fase do ciclo, é suficiente para definir com assertividade a CFA de um animal, devido sua alta repetibilidade em um mesmo indivíduo e sua grande variabilidade entre indivíduos (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007, 2008; MOROTTI et al., 2017).

A população folicular antral, avaliada através da CFA, pode influenciar as taxas de concepção em programas de IATF – inseminação artificial em tempo fixo (BARUSELLI et al., 2012; MOROTTI et al., 2015; 2017). A relação entre a CFA, performance reprodutiva e eficiência em biotécnicas reprodutivas em bovinos tem sido avaliada em inúmeros estudos (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2009; SILVA-SANTOS et al., 2014; ZANGIROLAMO et al., 2018).

Alguns estudos não encontraram diferença na concepção de vacas Nelore submetidas à IATF quando comparou vacas de alta, baixa ou intermediária CFA (RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2016). No entanto, trabalhos mais

recentes têm demonstrado que fêmeas Nelore de baixa CFA submetidas à IATF tem resultado em maiores diâmetros foliculares, maiores CLs, maiores concentrações de P4 (Morotti et al., 2018; Lima et al., 2020), maiores taxa de concepção (MOROTTI et al., 2018; MORAES et al., 2019; LIMA et al., 2020). Além disso, oócitos e células cumulus de doadoras de baixa contagem apresentaram regulação positiva da expressão de genes relacionados à comunicação intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, divisão celular, crescimento folicular, manutenção celular, esteroidogênese e resposta ao estresse celular.

A CFA tem sido sugerida como parâmetro de seleção para animais de alta fertilidade e rendimento para OPU e produção *in vitro* de embriões (PIV) (MOROTTI et al., 2017; SENEDA et al., 2019; 2020; GARCIA et al., 2020). Como doadoras de oócitos, sabe-se que há uma vantagem numérica dos animais de alta CFA, os quais produzem maior número de oócitos por sessão de OPU, maior número de embriões, blastocistos e blastocistos eclodidos (IRELAND et al., 2007; PONTES et al., 2010; SANTOS et al., 2016). Animais *Bos indicus* ou mestiços *Bos indicus-taurus* com maior número de oócitos recuperados também apresentaram maior número de embriões produzidos e que deram origem a um maior número total de gestações (PONTES et al., 2010; SILVA-SANTOS et al., 2014).

Santos et al. (2016) e Silva-Santos et al. (2014a), utilizando animais *Bos indicus* e cruzamentos *Bos indicus-taurus*, respectivamente, encontraram maiores taxas de clivagem e blastocistos com animais de alta quando comparados aos de baixa CFA. Os animais de alta CFA apresentam uma vantagem numérica bastante expressiva na produção *in vitro* de embriões (SILVA-SANTOS et al., 2014a).

2.4 SUPEROVULAÇÃO

Os primeiros registros de transferência de embriões produzidos *in vivo* no Brasil datam da década de 1980 e, no final da década de 1990, o país já tinha um mercado consolidado de produção e transferência de embriões bovinos. A atividade contava, inclusive, com uma sociedade científica específica a Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões - SBTE, criada em 1985, atualmente Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Em 1997 o Brasil, ainda, era uma referência apenas regional na atividade, respondendo por 68,3% dos embriões transferidos na América Latina (GONÇALVES, 2019).

O principal objetivo da implantação dos programas de transferência de embriões em rebanhos de corte é o melhoramento genético (BÓ et al., 2012). A SOV/TE é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. A TE em bovino continua sendo um dos métodos mais econômicos e práticos para a obtenção do aumento das taxas de reprodução de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de leite quanto de corte, sua importância básica para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (GONÇALVES et al., 2008).

No bovino, se considera que houve resposta ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de ótima qualidade (CABODEVILA & TORQUATI, 2001). De acordo com Ferreira (2010), o princípio da superovulação envolve fornecer à fêmea maior nível de FSH que o normal, para que mais folículos sejam recrutados e selecionados. A superovulação é usada na técnica de TE e consiste na estimulação hormonal dos ovários da fêmea bovina doadora de embriões, com objetivo de induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente, evitando a divergência folicular e a dominância de um único folículo de modo que, após a indução da luteólise, ocorram múltiplas ovulações durante o mesmo cio. A ovulação hormonal induzida requer uma prematura luteólise.

Grandes variações na resposta superovulatória continuam sendo o maior obstáculo na rotina da produção de embriões bovinos (ADAMS, 1994). A ausência de uma compreensão exata da concentração, frequência de administração e momentos de aplicação do FSH podem ser as maiores razões para a variabilidade de resultados encontrados na maturação e crescimento folicular, assim como a interação FSH e LH. Além disso, outro fator limitante no sucesso da superovulação continua sendo a alta variabilidade individual na resposta a estimulação com gonadotrofinas, que pode em parte, estar relacionada a CFA da doadora.

Existem pelo menos três produtos comerciais com FSH de pituitária suína aprovados para superovulação em bovinos. A relação LH:FSH entre estes produtos variam de insignificantes a semelhantes em cada hormônio. No caso do Pluset® a razão LH:FSH é 1.0 enquanto no Folltropin® é de aproximadamente 0,12.

A questão prática sobre a possibilidade de superioridade de um ou outro produto é dúvida frequente entre pecuaristas e técnicos. Kelly et al. (1997) avaliaram mais ovulações e maior número de estruturas em novilhas e multíparas superovulada com Pluset®. Mikkola et al. (2017) realizaram um levantamento a partir de 3990 superovulações e subsequente colheita de embriões durante um período de 16 anos (2000 – 2015) em fazendas leiteiras finlandesas, além da transferência de embriões. As doadoras foram vacas (n = 975) e novilhas (n = 3015) das raças Holandesa e Ayrshire. A SOV foi realizada com injeções intramuscular de Folltropin® (Vetoquinol S.A., França) ou Pluset® (Laboratórios Calier, Espanha), em que o grupo Folltropin consistiu em 2592 superovulações, sendo 80% em novilhas e 20% em vacas enquanto no grupo Pluset as 1398 superovulações foram realizadas 66% em novilhas e 34% em vacas. As raças entre os grupos estavam distribuídas entre 58% Ayrshire e 41% Holandesas no grupo Folltropin e no grupo Pluset 78% e 22%, respectivamente. Quanto às doses decrescentes utilizadas nos tratamentos de cada produto, o grupo Folltropin recebeu 630 UI para vacas e entre 420 a 490 UI em novilhas e o grupo Pluset 850 UI para vacas e entre 500 e 600 UI em novilhas. Os resultados obtidos apresentaram que do ponto de vista prático, recuperam-se números iguais de embriões transferíveis de qualidade e estágios de desenvolvimento semelhantes, que são capazes de produzir o mesmo número de gestações.

Ao se avaliar as doses recomendadas para raça Nelore, Wünsche Júnior et al. (2008) utilizando a dose de 250 UI de Pluset® comparou a produção de estruturas após uma ou duas lavagens uterinas e concluiu que a segunda lavagem não aumentou significativamente as médias de estruturas recuperadas, embora tenha encontrado eficiência na SOV com a dose empregada. Em outro estudo, Alvarez et al. (2011) trabalhando com vacas Caracu e Nelore utilizou a dose para superovulação de 400 UI de FSH:LH (Pluset®) e concluiu que os resultados são indicativos de que vacas Nelore e Caracu manejadas e superovulada em ambiente tropical apresentam resposta ovariana e produção de embriões semelhante. Já Pinto-Neto et al. (2000) concluiu a viabilidade do uso de vacas Nelore em programas de superovulação utilizando a dose de 350 UI (Pluset®) viabilizando como um método efetivo de superovulação, coleta e manipulação de embriões.

2.5 RELAÇÃO ENTRE CFA E SUPEROVULAÇÃO

Recentemente, buscou-se verificar possível correlação entre a população folicular e a fertilidade em bovinos. Em fêmeas *Bos taurus*, foi relatou-se correlação entre a população de folículos pré-antrais e antrais, bem como associação da menor quantidade de folículos antrais com menor fertilidade (IRELAND et al., 2008; MOSSA et al., 2012). Por outro lado, vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* não demonstraram haver correlação entre as populações pré-antral e antral (SILVA-SANTOS et al., 2013). Em fêmeas *Bos indicus-taurus* e *Bos indicus*, a população de folículos antrais influenciou positivamente a produção de embrião (Santos et al., 2012; Max et al., 2013), mas, após protocolo de IATF, fêmeas Nelore com baixa quantidade de folículos antrais apresentaram melhores taxas de prenhez em relação às de alta população folicular (MENDONÇA et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

Ireland et al. (2007) demonstraram que novilhas com alta CFA após superovulação recuperam maior número de embriões que as de baixa CFA, também concluiu que o número de embriões transferíveis é superior em animais com alta CFA. Em suas conclusões ele sugere que a avaliação fenotípica baseada na CFA pode ser útil para melhorar os procedimentos de superovulação, porém não foi considerada uma sugestão para melhora de resultados em animais com baixa CFA. Em um trabalho mais recente, Silva-Santos et al. (2014) comparam doadoras *Bos indicus- Bos taurus* com alta e baixa CFA mensurando-se que a taxa de estruturas recuperadas, número de embriões por colheita e número de embriões congeláveis foi superior nas doadoras de alta CFA, porém verificou que a taxa de congelamento não apresenta diferença significativa quando se compara doadoras de alta ou baixa CFA. Ambos os trabalhos foram realizados com a mesma dose de FSH nas doadoras de alta e baixa CFA.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A.; OZAWA, T.; WIJAYAGUNAWARDANE, P.B.; SATO, K. Local Release of Steroid Hormones, Prostaglandin E2, and Endothelin-1 from Bovine Mature Follicles In Vitro: Effects of Luteinizing Hormone, Endothelin-1 and Cytokines. **Biology of Reproduction**, v.59, p.437-443, 1998.
- ALVAREZ, R. H.; MARTINEZ, A. C.; PIRES, R. M. L. Superovulação e produção de embriões em vacas *Bos taurus* (Caracu) e *Bos indicus* (Nelore) adaptadas ao ambiente tropical. **Boletim de Indústria Animal** 68.1 (2011): 1-5.
- ALVES, B. R. C.; RUAS, J. R. M.; AMARAL, T. F. et al. Desempenho de novilhas Holandês na produção de embriões F1 Holandês-Zebu, em condições tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias.**, v.16, p. 22-26, 2009.
- BARROS, C.M.; SATRAPA, R.A.; CASTILHO, A.C. et al. Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n.1, p.17-25, 2012.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F. T.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.
- BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-152, 2012.
- BASTOS, M. R. Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. 2012. 108 f. **Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2012.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: Baruselli, P.S.; Madureira, E.H. **Controle Farmacológico do Ciclo Estral**. São Paulo: USP, 2000. p.99-114.
- BÓ, G. A. Dinâmica Folicular Ovária en el Bovino. In: Baruselli, P.S.; Madureira, E.H. **Controle Farmacológico do Ciclo Estral**. São Paulo: USP, 2000. p.12-34.
- BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicle development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science.**, v.78, p.307-326, 2003.
- BÓ, G. A; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.

BÓ, G. A.; TRÍBULO, A.; MAPLETOFT, R. J. Atualización sobre la superovulación em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 5, 2006. Londrina. **Anais...** Londrina, 2012

Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L., Knight, P. G. & Ireland, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction** 73, 54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277> (2005)

CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotechnología de la reproducción** 1 ed., Argentina: Inta, 2001. p. 79-108

CARVALHO, B. C.; VARAGO, F. C.; RUAS, J. R. M.; VARGAS, M. W.; SANTOS, G. B.; SILVA, A. M. Produção de embriões em vacas zebuínas após superovulação com duas formulações comerciais de gonadotrofina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** 20.3 (2013).

FACIOLI, F. L.; ZANELLA, G. C.; DE MARCHI, F.; MARQUES, M. G.; MICHELON, P. R. P.; ZANELLA, E. L.; CAIRES, K. C.; REEVES, J. J., ZANELLA, R. A viabilidade econômica e a produção de embriões com o uso de FIV e SOV em bovinos da raça Wagyu. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.441, abr./jun. 2019. Gramado, RS

FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1ed. Juiz de Fora: Editar, 2010.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505. 1996.

FIGUEIREDO, M. M. N.; FONSECA, F. A.; TORRES, C. A. A.; GALIMBERTI, A. M.; ALMEIDA, C. D. Dinâmica Folicular Ovariana de Vacas Leiteiras no Pós-Parto após Tratamento com Buserelina (GnRH) e Cloprostenol (PGF 2α). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29 (3): 725 – 731. 2000.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143 – 152. 2007.

Fortune, J. E.; Rivera, G. M.; Yang; M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas

Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl.1, p.210, 2005b [Resumo].

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among events in cattle during oestrous cycle with two or three follicular waves. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989

GINTER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ed. São Paulo: Roca, 2008.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 156-159, abr./jun. 2019., 2019

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Folliculogenesis, Egg maturation and Ovulation. In: HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7th Ed. Philadelphia: Lippincott, 2000.

IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, n.6, p.1687-1695, 2007.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle¹. **Biology of Reproduction**, v.79, n.6, p.1219-1225, 2008.

IRELAND, J. J.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P. G.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle, **Biology of Reproduction**, Volume 80, Issue 5, 1 May 2009, Pages 954–964.

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

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos-: Texto e Atlas Colorido**. Artmed Editora, 2016.

MARTINS, C. M. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. **Tese de mestrado**, 2005

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia** 16.2 (2009): 270-279.

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

MIKKOLA, M.; HASLER, J. F.; TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction and Fertility Dev.** 2020; 32:104-24.

MOGOLLÓN, E. M.; JIMENEZ, A. L.; CARDONA, J. R.; NARVAEZ, H. J.; QUIRINO, C. R.; BELTRAME R. T. Resposta superovulatória em vacas e novilhas Holandesas no Valle de Chiquinquirá, Colômbia. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 16, Ed. 163, Art. 1102, 2011.

MORAES, F. L. Z.; DINIZ, L. T.; SILVA, C. B.; MOROTTI, F.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M.; LUNARDELLI, P. A. Influência da contagem de folículos antrais na taxa de concepção de vacas submetidas a IATF. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, 3, 311-313, 2016.

MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; SILVA, C. B.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.514-520, 2017.

NOGUEIRA, E., MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. "Biotécnicas reprodutivas para aceleração do melhoramento genético." **Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE)** (2013).

OLIVEIRA, C. S. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio "Biotécnicas da Reprodução em Bovinos" no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica / Clara Slade Oliveira, Raquel Varela Serapião e Carolina Capobiango Romano Quintão. – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2014. 54 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175).

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; MOTA, M. F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, Q. S.; ALVIM, M. T. T. Desempenho de Vacas Doadoras da Raça Nelore, em Programa de Transferência de Embriões. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 3.2 (2000).

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCINATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S. FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, n.8, p.1349-1355, 2010.

RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Effect of somatotropin on follicular population, oocyte

retrieval and in vitro embryo production in Gir cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n.2, Mar./Abr. 2007.

RODRIGUES, A. S.; OLIVEIRA, S. N.; LOIOLA, M. V. G.; ANDRADE, B. H. A.; FERRAZ, P. A.; AYRES, M. C. C.; BITTENCOURT, R. F.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Fertilidade de fêmeas Nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48.7 (2013): 801-804.

RODRIGUES, A. S.; OLIVEIRA, S. N.; LOIOLA, M. V. G.; FERRAZ, P. A.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; ARAUJO, E. A. B.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; RIBEIRO FILHO, A. L. Contagem de folículos antrais em fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. **Ciência Rural**. 2015, vol.45, n.4, pp.711-717

ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 81-90, 1991.

SÁ FILHO, M. F.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G.; BARUSELLI, P. S. Avanços nos Protocolos Reprodutivos em Fêmeas Bovinas Utilizando Sêmen Sexado. São Paulo, Brasil (2010).

SANTIAGO, L. L.; TORRES, C. A. A.; NOGUEIRA, E. T.; COSTA, E. P. D.; GUIMARÃES, J. D. Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(1), 350-362.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v.165, p.17-21, 2016.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS G. M. G.; KOETZ JÚNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; URBANO, M. R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C. M.; SENEDA, M. M. Antral follicle populations and embryo production - In Vitro and In Vivo - of *bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.2, p.228-232, 2014

SINGH, J.; DOMINGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology** 2004; 62:227-43.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1857-1872, 1994.

SOARES, P. H. A.; JUNQUEIRA, F. S. Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. **PUBVET** 13 (2018): 148.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 210-216, 2012.

TIRAPELLI, A. C. N.; FERNANDES, C. A. C.; GIOSO, M. M.; VARAGO, F. C.; PALHÃO, M.; ROSSI, T. C.; GARCIA, J. A. D. Redução da resposta superovulatória de fêmeas bovinas superestimuladas com FSH em doses split. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2014, vol.66, n.6, pp.1631-1637.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, Dec. 2000.

VIANA, J. H. M. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm. Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro animals. **Embryo Technology Newsletter**. 2019; 36:1-26.

WEBB, R.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v.68, p.257-284, 1999.

WÜNSCHE JÚNIOR, A. G.; BARREIROS, T. R. R.; BEZERRA, G. A.; AZEVEDO, J. R.; OLIVEIRA, A. C. S.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. Avaliação de uma segunda lavagem uterina sobre a recuperação de embriões em vacas Nelore. **Semina: Ciências Agrárias** 29.3 (2008): 677-683.

ZANENGA, C. A.; MARQUES, M. O.; SANTOS, I. C. C.; VALENTIN, R.; BARUSELLI, P.S. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 626-627, 2003

ZANGIOROLAOM, A. F.z MOROTTI, F.; SILVA, N. C.z SANCHES, T. K.; SENEDA, M. M. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reprodutivo**, 2018; 15:310-5.

3. HIPÓTESE

Maiores doses de FSH (Pluset®), no programa de superovulação, melhoram o rendimento na produção de embriões de doadoras da raça Nelore com alta e baixa CFA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção embrionária em doadoras Nelore com baixa e alta CFA submetidas à superovulação em tempo-fixado com baixa e alta dose de FSH (Pluset®).

4.2 Objetivos Específicos

Determinar o efeito da CFA e de diferentes doses de FSH na resposta ovariana de doadoras Nelore submetidas à superovulação em tempo-fixado.

Determinar o efeito da CFA e de diferentes doses de FSH na produção total de estruturas, embriões totais e viáveis de doadoras Nelore submetidas à superovulação em tempo-fixado.

Determinar o efeito da CFA e de diferentes doses de FSH na produção de embriões congeláveis de doadoras Nelore submetidas à superovulação em tempo-fixado.

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo submetido à publicação na revista *Theriogenology* – Science Direct em fevereiro de 2021. Atualmente se encontra em revisão após realizar uma primeira rodada de correções.

“*In vivo* embryo production in donors with low and high antral follicle counts superovulated with low and high FSH doses”

INTRODUCTION

Although the application *in vitro* embryo production (IVEP) has increased at a higher rate in the last 10 years, embryo production via a multiple ovulation and embryo transfer (MOET - *in vivo* method) program still represents a large fraction of the world production of cattle embryos [1]. Over the years, pharmacological strategies for controlling the estrous cycle, physiological mechanisms of ovarian superstimulation involving the use of hormonal protocols [2], and a series of factors that affect embryonic performance have become increasingly well understood [3], allowing a choice of strategies and the early control of factors that can improve embryo yield [4].

Among a series of factors that affect the *in vivo* production of bovine embryos [3, 4], the antral follicle count (AFC) has been identified as one of the most relevant and is directly linked to donor selection [5-7]. In this context, the AFC and the dosage of anti-Mullerian hormone (AMH) stand out as strategic parameters linked to the number of recruited follicles and the ovarian follicular reserve [8-13]. AFC and AMH dosage are individual reproductive parameters that are characterized by great variability among females but show high repeatability within the same animal [5, 6, 8, 14-17]. Additionally, a strong correlation ($r = 0.88$) between AMH and AFC has been found [15], and both are considered indicators of the ovarian response [7-10, 13, 18]. While AMH measurement requires laboratory analysis, the AFC can be accessed via a single ultrasound exam of both ovaries by a trained operator at any time in the cycle to classify females into low-, intermediate- and high-AFC groups [9, 14, 17]. Additionally, this characteristic has become an important marker for embryo donor selection via either the *in vitro* [19, 20] or *in vivo* method [5-7, 9, 13].

Once a female's high genetic potential is guaranteed [16], AFC can be used as a parameter for selecting donors with high AFC [7, 9, 20]. The

relationship between AFC and reproductive performance has been proven by different reproductive biotechnological approaches [5, 6, 8-10, 15, 19]. For example, a high AFC was shown to be positively associated with a greater embryo yield [6, 19, 20], and a low AFC has been related to ovarian follicular dynamics that are favorable for greater fertility [17, 21], a higher pregnancy rate following timed artificial insemination (TAI) [17, 21, 22] and greater reproductive longevity [23]. Despite this, one aspect that is not yet understood is whether the ovarian response in donors with different AFCs may vary depending on the FSH dose. To date, no study has evaluated the effect of the AFC category in association with different FSH doses. Therefore, in this study, we hypothesized that the ovarian response to MOET in donors with different AFCs is variable depending on the FSH dose. Therefore, the aim of this study was to evaluate embryo production in Nellore donors with low and high AFCs subjected to a commercial MOET program using low and high FSH doses for superovulation (SOV).

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

This study was conducted according to the standards of the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Londrina, approved under identification number 5898.2014.76.

Location, animals and management

The present study was performed during the typical beef cattle breeding time in South America on a farm located at 21°31'45.2"S and 52°06'32.7"W under tropical climate conditions. The average annual temperature in the area is 24.5°C, with 1.241 mm of precipitation.

For this study, Nellore breed (*Bos taurus indicus*) embryo donors with a mean live weight of 522 ± 76 kg (minimum 412, maximum 688 kg) and a mean body condition score (BCS) of 3.5 (scale 1 to 5) were evaluated to determine the number of antral follicles (AFC) and subjected to two MOET programs.

The animals were kept in a *Brachiaria brizanta* cv. Marandu pasture and received a total mixed ration (65% milled corn, 20% soybean meal, 5% mineral nucleus, 3% urea and 7% salt) at a rate of 1.5 kg/animal/day, in addition to mineral salt and water *ad libitum*.

Donor preparation, antral follicle counting and experimental design

Potential embryo donors (n = 24) underwent a presynchronization protocol 30 days before (D-30) starting the MOET program. On a random day of the estrous cycle (D-30), all cows underwent an ovulation synchronization protocol that consisted of the insertion of an intravaginal progesterone device (P4, 1 g, ReproNeo®, Globalgen, Jaboticabal, São Paulo, Brazil) and the intramuscular (IM) injection of 2 mg estradiol benzoate (EB, 2 mL, Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil) and 7.5 µg of cloprostenol (PGF2α, 1 mL, Croniben®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil). On D-26 (four days after device insertion), the AFC was determined by a single experienced veterinarian. Eight days after device insertion (D-22), the P4 device was removed, and 7.5 µg of PGF2α, 300 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, 1.5 mL, Ecegon®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil) and 1 mg of estradiol cypionate (EC, 1 mL, Croni-Cip®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil) were injected IM.

Briefly, the AFC of each donor was assessed on the fourth day after the beginning of the synchronization protocol (D-26) by ultrasound with a 7.5 MHz transrectal linear transducer at (Aloka SSD-500, Aloka Co. Ltda., Tokyo, Japan). Both the right and left ovaries (the pair) were evaluated to determine the total number of antral follicles (follicles with diameters > 2 mm), as previously described by Burns et al. [14] and Morotti et al. [17]. To standardize the AFC, every ovarian surface was evaluated from the extremity towards the pedicle to more precisely determine the number of antral follicles. Based on the AFC results, donors with a consistently low AFC (n = 8; ≤ 15 follicles; mean = 10.00 ± 0.91 follicles) or high AFC (n = 8; ≥ 25 follicles; mean = 36.13 ± 6.05 follicles) were selected to receive the MOET program with a low dose (150 IU) or high dose (300 IU) of follicle-stimulating hormone (FSH - Pluset®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil). Initially, all donors (low- and high-AFC) underwent a first MOET program involving a dose of 150 IU of FSH (low-dose), and 45 days later, all donors (n = 16) underwent a second program involving a dose of

300 IU of FSH (high-dose) (Figure 1). Each AFC group included the same proportion of primiparous and multiparous cows.

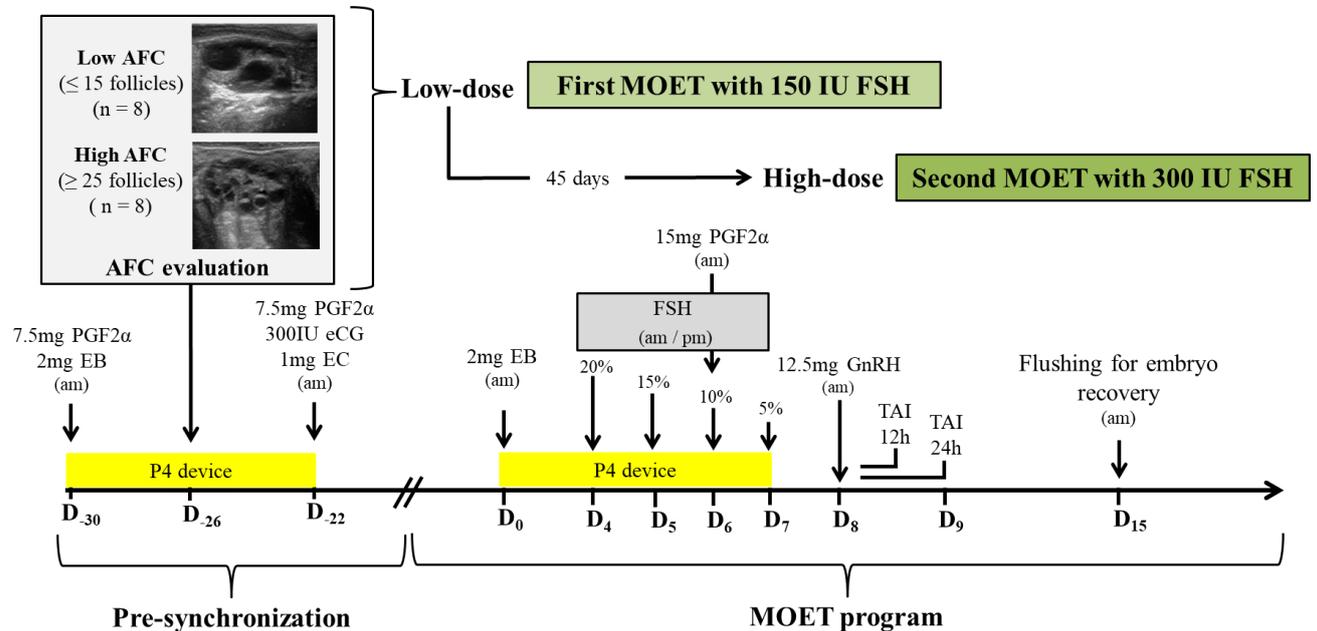


Figure 1 - Experimental design, presynchronization protocol and multiple ovulation embryo transfer (MOET) program applied in Nellore (*Bos indicus*) donors with low (≤ 15 follicles) and high (≥ 25 follicles) antral follicle counts (AFCs), which received low (150 IU) and high doses (300 IU) of follicle-stimulating hormone (FSH) during the MOET protocol. In the first MOET program, a total of 150 IU of FSH (Pluset®) per donor (low and high AFC) was administered in eight decreasing doses at 12 h intervals, distributed as follows: 40% (60 IU) on Day 4 (30 IU am and 30 IU pm), 30% (45 IU) on Day 5 (22.5 IU am and 22.5 IU pm), 20% (30 IU) on Day 6 (15 IU am and 15 IU pm) and 10% (15 IU) on Day 7 (7.5 IU am and 7.5 IU pm). For the second MOET program, a total of 300 IU of FSH (Pluset®) per donor (low and high AFC) was administered in eight decreasing doses at 12 h intervals, distributed as follows: 40% (120 IU) on Day 4 (60 IU am and 60 IU pm), 30% (90 IU) on Day 5 (45 IU am and 45 IU pm), 20% (60 IU) on Day 6 (30 IU am and 30 IU pm) and 10% (30 IU) on Day 7 (15 IU am and 15 IU pm). (EB – estradiol benzoate; P4 – progesterone; PGF2α – cloprostenol; eCG – equine chorionic gonadotrophin; EC – estradiol cypionate; GnRH – buserelin acetate; TAI – timed artificial insemination).

Multiple ovulation protocol and embryo collection

After presynchronization, all donors underwent an SOV protocol (table 1) that consisted of inserting an intravaginal P4 device (ReproNeo® 1.0 g) and the administration of 2 mg EB (2 mL Bioestrogen®) on a random day of the estrous cycle (D0). For the first MOET program, all cows received 150 IU of FSH (Pluset®), distributed in decreasing doses twice a day (same times each day in the morning and afternoon), starting with two applications of 30 IU of FSH on D4 (20% of the total); two applications of 22.5 IU of FSH on D5 (15% of the total); and two applications of 15 IU of FSH (10% of the total) plus 15 mg of PGF2 α (Croniben®) on D6. The P4 device was removed on the morning of D7, and the last two doses of 7.5 IU of FSH were administered, one in the morning and one in the afternoon (5% of the total). On the morning of D8, 10.5 mg of buserelin acetate (GnRH, 2.5 mL, Gonaxal®, Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil) was administered. The donors were inseminated on both the afternoon of D8 (12 h from GnRH) and the morning of D9 (24 h from GnRH).

Immediately before uterine flushing, each donor was evaluated for their response to the superstimulation protocol using ultrasound to estimate the number of corpora lutea (CL). Uterine flushing was performed 7 days after GnRH injection, and the embryos were recovered using a two-way Foley catheter passed through the cervix as described by Neto et al. [24] on D15. The catheter tip was placed cranially to the uterine bifurcation, and each uterine horn was flushed separately. The uterus was flushed eight to ten times using a 2 L total volume of Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Reprodux, Itapira, São Paulo, Brazil). Embryos were collected in a closed system coupled to an embryo collection filter (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brazil). Then, an aliquot of the filtered liquid was transferred to the search plate, and embryos were identified and classified with a stereomicroscope according to the International Embryo Transfer Society (IETS) criteria [25]. Embryos receiving grades of I, II and III were defined as viable, and embryos with grades of I and II were frozen and stored at -196°C.

Frozen-thawed sperm (16×10^6 spermatozoa per dose) from Nellore bulls ($n = 4$) were used for insemination. All bulls were previously tested and presented similar fertility ($P > 0.1$). The sperm from the four bulls were used in equal amounts in the two rounds of MOET in both the low and high-AFC groups.

Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA using the procedure for an adjusted mixed effect model. In the model, the effects of the AFC group (low vs. high), FSH dose (150 vs. 300 IU) and the AFC*dose interaction (low-AFC 150 IU, high-AFC 150 IU, low-AFC 300 IU and high-AFC 300 IU) were included as fixed factors. Furthermore, the donor was considered a random factor in the model. Weight, BCS and age were considered to be covariates. In the case of a significant effect, Tukey's test was used as a post hoc mean test. For descriptive analysis, data are presented as the mean \pm standard error of the mean and/or as a percentage (%). The level of significance for rejecting the null hypothesis was $P \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using Minitab® 18.1.1 software.

RESULTS

Regarding the effect of AFC, only the number of CL was higher ($P = 0.01$; Table 1) in donors with a high AFC than in those with a low AFC. For all other variables monitored in this study (Table 1), donors with a low AFC showed similar ($P > 0.1$) reproductive performance (total structures, not fertilized, degenerate, viable and freezable embryos as well as the proportions of viable and freezable embryos) to high-AFC donors.

On the other hand, a significant effect ($P < 0.05$) was associated with the FSH dose (Table 1). In general, the 300 IU dose of FSH resulted in greater numbers of CL (20.5 vs. 9.4; $P = 0.001$), total structures (12.2 vs. 6.2; $P = 0.002$), viable (9.1 vs. 4.9; $P = 0.008$) and freezable (7.8 vs. 3.0; $P < 0.0001$) embryos than the 150 IU dose. The number of oocytes that were not fertilized and degenerate embryos were similar ($P > 0.1$) between the groups receiving FSH doses.

For most of the embryonic variables monitored in this study, a significant interaction effect ($P < 0.05$) was observed between the AFC and the FSH dose (Table 2). According to this interaction, donors with a high AFC treated with a high FSH dose (300 IU) presented the greatest average numbers of CL ($P = 0.001$), total structures ($P = 0.02$) and viable ($P = 0.03$) and freezable embryos ($P < 0.01$). On the other hand, donors with a low AFC treated with 300 IU of FSH showed similar reproductive performance ($P > 0.1$) to the high-AFC group treated with 300 IU.

Table 1 - Reproductive performance of Nellore donors (n = 16) with low (≤ 15 follicles, n = 8) and high (≥ 25 follicles, n = 8) antral follicle counts (AFCs) subjected to the Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) program with a low (150 IU) or high dose (300 IU) of follicle-stimulating hormone (FSH/Pluset®).

Variables	AFC		P-value	FSH dose		P-value
	Low (m \pm se)	High (m \pm se)		150 IU (m \pm se)	300 IU (m \pm se)	
Number of CL (n)	10.7 \pm 1.6	19.2 \pm 3.1	0.01	9.4 \pm 2.3	20.5 \pm 2.4	0.001
Total structures/collection (n)	7.5 \pm 1.7 (120/16)	10.9 \pm 2.0 (175/16)	0.70	6.2 \pm 1.7 (100/16)	12.2 \pm 1.9 (195/16)	0.002
Not fertilized (n)	1.4 \pm 0.8	2.0 \pm 0.5	0.50	1.0 \pm 0.4	2.4 \pm 0.8	0.58
Not fertilized (%)	18.6 \pm 8.4 (23/120)	15.5 \pm 3.8 (32/175)	0.34	15.7 \pm 6.6 (16/100)	18.3 \pm 6.4 (39/195)	0.78
Degenerate (n)	0.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3	0.33	0.3 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3	0.94
Viable embryos/collection (n)	5.7 \pm 1.5 (92/16)	8.2 \pm 1.5 (132/16)	0.36	4.9 \pm 1.4 (84/16)	9.1 \pm 1.5 (156/16)	0.008
Viable/total embryos (% , n/N)	94.8% (92/97)	92.3% (132/143)	-	94.0% (79/84)	92.9% (145/156)	-
Degenerate/total embryos (% , n/N)	5.1% (5/97)	7.7% (11/143)	-	5.9% (5/84)	7.0% (11/156)	-
Freezable embryos/Collection (n)	4.4 \pm 1.3 (70/16)	6.4 \pm 1.3 (103/16)	0.33	3.0 \pm 0.9 (48/16)	7.8 \pm 1.3 (125/16)	<0.0001
Freezable/total embryos (% , n/N)	76.1% (70/92)	78.0% (103/132)	0.22	60.8% (48/79)	86.2% (125/145)	0.002

Table 2 - Effect of the interaction between the antral follicle count (AFC; Low \leq 15 follicles and High \geq 25 follicles) and the dose of follicle-stimulating hormone (FSH; Low dose 150 IU and High dose 300 IU) on the *in vivo* embryo production performance in Nellore donors (n = 16).

Variables	Low 150 IU (m \pm se)	High 150 IU (m \pm se)	Low 300 IU (m \pm se)	High 300 IU (m \pm se)	<i>P</i> -value
Number of CL (n)	6.4 \pm 1.5 ^b	12.4 \pm 4.1 ^b	15.0 \pm 1.9 ^{ab}	26.0 \pm 3.4 ^a	0.001
Total structures/collection (n)	4.6 \pm 2.1 ^b (37/8)	7.9 \pm 2.7 ^{ab} (63/8)	10.4 \pm 2.4 ^{ab} (83/8)	14.0 \pm 2.8 ^a (112/8)	0.02
Not fertilized (n)	0.2 \pm 0.1	1.7 \pm 0.8	2.6 \pm 1.4	2.2 \pm 0.7	0.49
Degenerate (n)	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.5	0.79
Viable embryos/collection (n)	4.2 \pm 2.2 ^b (34/8)	5.6 \pm 1.9 ^b (45/8)	7.2 \pm 2.2 ^{ab} (58/8)	10.9 \pm 2.1 ^a (87/8)	0.03
Viable/total embryos (% , n/N)	97.1% (34/35)	91.8% (45/49)	93.5% (58/62)	92.5 (87/94)	-
Freezable embryos/collection (n)	2.4 \pm 1.5 ^b (19/8)	3.6 \pm 1.3 ^b (29/8)	6.4 \pm 1.9 ^{ab} (51/8)	9.2 \pm 1.7 ^a (74/8)	0.004
Freezable/total embryos (% , n/N)	55.9% ^b (19/34)	64.4% ^b (29/45)	87.9% ^a (51/58)	85.1% ^a (74/87)	0.01

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study provides the first analysis of embryo production performance in donors with different AFCs subjected to a MOET program with different FSH doses. We found that the FSH dose used for MOET may vary depending on the number of antral follicles present. Although low- and high-AFC donors showed similar results for most embryonic variables, the higher FSH dose (300 IU) was more effective in increasing the efficiency of the MOET program. Interestingly, this study also showed an interaction in which the treatment of donors with a high count with the highest FSH dose resulted in the best performance in terms of embryo yield. In addition, we found that the use of a high FSH dose in females with a low AFC resulted in embryonic performance similar to that of donors with a high count treated with a high FSH dose. In terms of practical importance for MOET programs, in addition to the importance of the selection of donors with a high AFC, which is already well established and recommended by several studies [5, 6], the present study highlights the importance of adjusting the FSH dose based on the AFCs of donors; additionally, the results of the present study have shown that 300 IU of FSH resulted in the highest average number of embryos from donors with high and low AFCs.

An evaluation of the isolated effect of AFC showed that donors with low and high AFCs responded similarly in terms of the total numbers of structures, viable and freezable embryos, unfertilized oocytes and degenerate embryos; the one exception was that the number of CL was higher in donors with a high count. A high donor AFC has previously been positively associated with embryo yield, resulting in greater production of structures by collection and viable embryos and freezing by collection [5, 6, 10]. The same association has been observed for IVEP, in which donors with a high AFC show greater production of oocytes and embryos through ovum pick up (OPU) [6, 19, 20, 26, 27] in both *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. In the present study, the similarities observed between the low- and high-AFC groups may be explained by the use of the Nellore breed (*Bos indicus*), which usually exhibits a high embryo yield [19, 26, 27] and it may probably be related to the lower interval of AFC between the group of low (≤ 15 follicles) and high AFC (≥ 25 follicles) in this study, in relation to the study by Silva-Santos et al. (2014) and Santos et al. (2016) who used the intervals ≤ 10 follicles (low-AFC) and ≥ 40 follicles (high-AFC).

In addition, it is worth noting that the farm where the experiment was carried out has performed the commercial selection of Nellore donors for over 20 years, in which animals that do not usually respond to MOET programs, regardless of AFC, are excluded from the farm. Nevertheless, there is a complete consensus in the literature that the selection of donors with a high AFC results in quantitative and qualitative advantages over the use of donors with a low AFC [5-10, 15, 19, 20].

The evaluation of the isolated effect of the FSH dose also showed interesting results, which were in line with our hypothesis. We initially hypothesized that the need for FSH for SOV in a donor depends on the AFC category. Soon, we imagine that a female with a high AFC will need to receive a higher FSH dose, requiring an adjustment of the SOV protocol dose. In this context, it was clear that 300 IU of FSH resulted in a better performance in terms of the numbers of CL and total structures and the total numbers and proportions of viable and freezable embryos in relation to the 150 IU dose. In general, this was observed for both high- and low-AFC donors. For example, the 300 IU dose resulted in an average of 4 more viable embryos than the 150 IU dose. There are few studies that have carried out SOV in *Bos indicus* females, and there are no reports of studies that have examined the association with AFC in the design.

Doses of 300, 400 and 500 IU of FSH (Pluset®) were evaluated in Nellore donors, and the best performance in terms of the total production of viable structures and embryos was also obtained at a dose of 300 IU [28]. In animals of the same breed receiving 333 IU of FSH (Pluset®), Pontes et al. [26] reported an average of 2 to 12.5 embryos per donor. Although the donor AFC was not reported in their study, all donors had been subjected to OPU and showed average oocyte recovery of over 16 oocytes. On the other hand, using a different commercial preparation of FSH (200 mg of Folltropin®) in Braford heifers with low and high AFCs, Silva-Santos et al. [6] revealed that high-AFC donors responded by showing greater numbers of structures per collection (8.80 vs 2.25), total embryos (6.95 vs 1.90) and freezable embryos (5.45 vs 1.70) in than females with a low AFC. However, the proportion of freezable embryos was similar between the high- (78.42%) and low-AFC groups (89.47%). Similar performance was found by Ireland et al. [5] when administering 420 IU of FSH (Folltropin®) to beef heifers with low and high AFCs. The estimated numbers of CL recovered embryos and transferable embryos were higher for donors with a high AFC, although the proportion of

transferable embryos was higher for donors with a low AFC.

In our study, neither the AFC nor the dose of FSH affected embryo quality or developmental stage. Similarly, studies have revealed that doses of FSH ranging from 200 to 400 IU do not exert harmful effects on the quality of the oocytes and embryos, regardless of the donor's AFC [4, 26, 29-31]. In the same context, another condition that has generated discussion is related to commercial FSH preparations, which may contain low or high proportions of LH. Preparations containing a higher proportion of LH have been associated with a lower ovulatory rate and lower-quality embryos [32, 33]. However, a study that evaluated the results of MOET programs involving Folltropin (dose of 420 to 490 IU in heifers or 630 IU in cows) and Pluset (dose of 500 to 600 IU in heifers and 850 IU in cows) over 16 years of data collection in dairy cattle revealed that the number of structures and transferable embryos obtained were similar for the two products, as were the embryonic quality and stage of development [34]. In addition, it should be noted that the dose of FSH, regardless of the commercial preparation, may vary depending on the subspecies, productivity level, SOV protocol, nutrition, environment [2-4, 6, 10] and AFC, as revealed in the present study.

According to an overall assessment, the results demonstrate that animals of different AFC classes benefit differently from the FSH doses used in the SOV protocol. While other studies have shown good results with varying doses of FSH or using donors with higher AFCs [3-5, 34], the present study demonstrates that these two factors interact. In this context, two important findings of this interaction must be highlighted: first, it is related to the fact that donors with a high AFC respond better to a high dose of FSH. This group showed the best embryo production performance in our study, which reinforces our hypothesis that an increase in FSH in high-count donors results in a better embryo yield, possibly because the demand for FSH is higher in donors with more antral follicles, since lower circulating FSH concentrations in donors with more antral follicles have been reported [14]. In general, at least in high AFC donors we also found that reducing the FSH dose was not advantageous (Table 2). The topic of how hormonal demand varies according to the AFC has also been discussed in other studies [8, 9, 17] and is most likely confirmed by the present study if we analyze the increasing trend of improvement in the results with increases in the AFC and dose of FSH (Table 2).

A second important aspect of this study is related to the results

obtained in donors with a low AFC treated with 300 IU of FSH. Low-AFC donors generally show lower performance in response to SOV [5, 6, 13, 18]; however, based on our results, the performance in terms of the ovarian response and the production of viable structures and embryos in females with a low AFC was compensated by the increase in the dose of FSH. This became evident when it was verified that donors with a low AFC superovulated with the highest dose of FSH responded in a similar way to the high-AFC donors treated with a 300 IU dose. These data are interesting because they reveal a notable management measure that can be applied in MOET programs when there is a need to reproduce donors with lower AFCs. Similar strategic adjustments have been proposed in other studies; for example, in females with a low AFC, MOET seems to be more efficient than IVEP [6], and in general, follicular synchronization pre-OPU results in an improvement of the efficacy of IVEP [20, 35].

Finally, we highlight the practical and applied relevance of the present study, which reveals the importance of adjusting the FSH dose according to the AFC. To the best of our knowledge, no studies have evaluated this interaction of the AFC category with the FSH dose. As recommended by previous studies [7, 9, 16, 20, 36], the choice of donor must still be based on genetic merit. In the sequence of the considered criteria, AFC can be considered an important aspect that can affect yield in the production of embryos. Therefore, based on our findings, adjustments in the FSH dose according to the AFC can be successfully applied to obtain the best performance in the use of this reproductive biotechnology.

CONCLUSION

The embryo yield was not influenced by the AFC category, but it was influenced by the FSH dose. Furthermore, a significant interaction of AFC with the FSH dose revealed that donors with a high AFC superovulated with the highest FSH dose presented the best performance in terms of embryo yield. Therefore, we emphasize that the FSH dose used in the MOET program can be varied according to the donor's AFC, which is an important adjustment to be considered in commercial programs for *in vivo* embryo production.

REFERENCES

- [1] Viana J. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm. Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro animals. Embryo Technology Newsletter 2019;36:1-26.
- [2] Baruselli P, Ferreira R, Sales J, Gimenes L, Sá Filho M, Martins C, et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. Theriogenology 2011;76:1583-93.
- [3] Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. Reprod Fertil Dev 2020;32:104-24.
- [4] Bó GA, Mapletoft RJ. Superstimulation of ovarian follicles in cattle: gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. Theriogenology 2020;150:353-9.
- [5] Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. Hum Reprod 2007;22:1687-95.
- [6] Silva-Santos KC, Santos GM, Koetz Junior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, et al. Antral follicle populations and embryo production in vitro and in vivo of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. Reprod Domest Anim 2014;49:228-32.
- [7] Zangirolamo AF, Morotti F, da Silva NC, Sanches TK, Seneda MM. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. Anim Reprod 2018;15:310-5.
- [8] Morotti F, Barreiros T, Machado F, González S, Marinho L, Seneda M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle. Anim Reprod 2015;12:479-86.
- [9] Morotti F, Zangirolamo AF, da Silva NC, da Silva CB, Rosa CO, Seneda MM. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. Anim Reprod 2017;14:514-20.
- [10] Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. Reprod Fertil Dev 2011;23:1-14.
- [11] Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sa Filho MF, Del Valle TA, et al. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. Reprod Domest Anim 2014;49:448-52.
- [12] Batista E, Guerreiro B, Freitas B, Silva J, Vieira L, Ferreira R, et al. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein)

and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domest Anim Endocrinol* 2016;54:1-9.

[13] Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé J-L, et al. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:932-44.

[14] Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 2005;73:54-62.

[15] Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 2008;79:1219-25.

[16] Morotti F, Santos G, Júnior CK, Silva-Santos K, Roso V, Seneda M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology* 2017;91:21-6.

[17] Morotti F, Moretti R, Dos Santos GMG, Silva-Santos KC, Cerqueira PHR, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2018;188:170-7.

[18] Rico C, Fabre S, Médigue C, Clemente Nd, Clément F, Bontoux M, et al. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod* 2009;80:50-9.

[19] Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, de Moraes FLZ, et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci* 2016;165:17-21.

[20] Garcia SM, Morotti F, Cavalieri FLB, Lunardelli PA, de Oliveira Santos A, Membrive CMB, et al. Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. *Anim Reprod Sci* 2020;221:106601.

[21] Lima MA, Morotti F, Bayeux BM, de Rezende RG, Botigelli RC, De Bem THC, et al. Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. *Sci Rep* 2020;10:1-13.

[22] Moraes FLZ, Morotti F, Costa CB, Lunardelli PA, Seneda MM. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2019;136:10-4.

- [23] Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Pursley JR, Ireland JJ. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. *J Dairy Sci* 2017;100:5019-27.
- [24] Neto AC, Sanches B, Binelli M, Seneda M, Perri S, Garcia JF. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology* 2005;63:1249-55.
- [25] Stringfellow DA, Seidel SM. Manual of the international embryo transfer society: The Society; 1998.
- [26] Pontes J, Nonato-Junior I, Sanches B, Ereno-Junior J, Uvo S, Barreiros T, et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009;71:690-7.
- [27] Pontes J, Sterza FM, Basso A, Ferreira C, Sanches B, Rubin K, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011;75:1640-6.
- [28] Visintin JA, Arruda RPd, Madureira EH, Mizuta K, Celeghini ECC, Assumpção MEODA, et al. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1999;36:267-72.
- [29] Silva J, Alvarez R, Zanenga C, Pereira G. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle¹. *Anim Reprod* 2018;6:440-5.
- [30] Albuquerque KP, Prado INd, Prado RMd, Cavallieri FLB, Rigolon LP, Barbosa OR. Superovulatory response, production and quality of embryos of cows fed on linseed or canola seed supplemented diets. *Acta Sci Anim Sci* 2012;34:321-7.
- [31] Alkemade S, Murphy B, Mapletoft R. Superovulation in the cow: Effects of biological activity of gonadotropins. In: Proceedings of the 12th Annual Convention of AETA, Portland 1993.
- [32] Gonzalez A, Lussier I, Carruthers T, Murphy B, Mapletoft R. Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 1990;33:519-29.
- [33] Kelly P, Duffy P, Roche J, Boland M. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 1997;46:1-14.
- [34] Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology* 2017;88:84-8.
- [35] Cavalieri F, Morotti F, Seneda M, Colombo A, Andreazzi M, Emanuelli I, et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology* 2018;117:57-60.

[36] Seneda M, Morotti F, Zangirolamo A, da Silva N, Sanches T, Blaschi W, et al. Antral follicle population in prepubertal and pubertal heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 2019;31:10-6.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A SOV é uma excelente ferramenta para aumentar a descendência de fêmeas Nelore de alta ou baixa CFA.

A dose de FSH influenciou positivamente na produção de embriões.

A interação entre CFA e dose de FSH revelou que doadoras com alta CFA superovulada com dose maior de FSH apresentam melhor desempenho na produção de embriões.

A dose de FSH pode ser variável, de acordo com a CFA da doadora, considerando-se ajuste importante em programas comerciais de superovulação.