ANA PAULA MANTOVANI

**Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica
equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus***

São Paulo
2010

ANA PAULA MANTOVANI

**Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica equina
(eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2349
FMVZ

Mantovani, Ana Paula
Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em
novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* / Ana Paula Mantovani. -- 2010.
92 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo,
2010.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. eCG. 2. Anticorpo. 3. Resposta imunológica celular. 4. Superovulação.
5. IATF. I. Título.

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* tratadas com diferentes doses de eCG", protocolado sob o nº1823/2009, utilizando 60 (sessenta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Antiequine Chorionic Gonadotropin (eCG) antibodies generated in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers treated with different doses of eCG", protocol number 1823/2009, utilizing 60 (sixty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MANTOVANI, Ana Paula

Título: Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*À minha vó Anna sempre presente em meus
pensamentos e no meu coração....
Pelo sublime sentimento que inexplicavelmente
construímos uma pela outra.
À você todo o meu amor e minha homenagem
eterna...*

Agradecimentos

À Deus, sempre presente em minha vida, por ter me iluminado e guiado meus passos nos momentos de maior dificuldade, e por ter me abençoado com pessoas muito especiais durante a minha caminhada, algumas das quais essenciais para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, referência de conhecimento, integridade e paixão pelo trabalho, por ter me dado o privilégio de sua orientação e de sua amizade.

Ao Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni, por ter contribuído de maneira imensurável na realização desse experimento, da elaboração a execução do projeto. Sem dúvida, um anjo que foi colocado em minha vida, sem o qual esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Dr. João Batista por ter possibilitado a condução de parte desse trabalho no Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba e por ter me auxiliado de maneira fundamental na realização do mesmo; e a sua esposa Maria Inês, pelo primor com que cuidou das minhas amostras.

À Mariana Santos Miranda, por todo comprometimento que teve comigo e com esse trabalho, e por ter me dado ainda o privilégio da sua amizade.

À Juliana, Claudia e Luciandra, por terem possibilitado o meu experimento fosse conduzido no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, do começo ao fim.

À minha mãe, minha fiel escudeira, minha companheira de todos os momentos, por simplesmente ser a melhor mãe do mundo.

Ao meu pai, por me enxergar por uma ótica que aumenta o meu tamanho real em pelo menos 100 vezes, me dando força para seguir buscando meus objetivos mesmo quando eles parecem inatingíveis.

Ao Luís Vettorato, meu amor e meu companheiro, de quem eu roubei muitas horas de minha atenção enquanto estudava ou escrevia, por ter estado sempre comigo e por ter compreendido a minha ausência e o adiamento dos nossos planos em função desse trabalho.

Aos meus irmãos e às minhas cunhadas, por todo incentivo, carinho e amizade que seguramente me fortaleceram nos momentos de dificuldade.

À minha sobrinha Luiza, um incentivo nato... pelo simples fato de existir e sorrir.

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho....

À todos os “Vettoratos”, por todo apoio e incentivo, e principalmente por terem sempre me recebido como membro da família. Em especial Maria Paula, por ainda ter me ajudado com as correções deste trabalho.

Às minhas amigas Daniela, Raquel e Débora por tornarem minha vida mais leve pela simples certeza de que, apesar da distância, estarão sempre presentes.

À toda a equipe do Pietro, Alessandra, Everton, Henderson, Gabriel, José Nélío, Lindsay, Manoel e Robertinha, pessoas pelas quais eu tenho inestimável respeito e admiração, por terem me dado a honra de fazer parte; é com muito orgulho que agradeço cada momento que pude absorver um pouquinho do enorme conhecimento que cada um possui.

Em especial ao Manoel, pela preocupação gratuita com o resultado do meu trabalho, ao Zé Nélío pela ajuda nos trabalhos de campo e ao Henderson pela ajuda na análise estatística.

Aos meus gestores e amigos Rogério Artacho e Gustavo Scaffa, pelo relacionamento de confiança, apoio e respeito mútuo, sem o qual não seria possível justificar as minhas eventuais ausências da empresa e conseqüentemente impossibilitaria essa conquista.

A todos os meus colegas de trabalho, por terem “segurado as pontas” durante minhas ausências; a Andressa e a Helena por terem também me ajudado com a elaboração dos diagramas e figuras.

A todos os colegas do VRA, em especial ao Marcílio e à Paola, por estarem sempre dispostos a ajudar.

À todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, principalmente à Harumi e à Thais pela amizade, gentileza e eficiência.

Às funcionárias da biblioteca, em especial a Elza e a Sandra, por terem me atendido sempre com muito mais atenção do que simplesmente a necessária.

Enfim, à todos aqueles com quem eu tive a oportunidade de conviver e aprender durante meu curso de doutorado, certamente pessoas importantes não foram citadas aqui, não por descaso mas provavelmente por um lapso da minha péssima memória, para essas pessoas fica meu pedido de desculpas e meu agradecimento.

Muito Obrigada!

“Eu não acreditava que houvesse no mundo um lugar tão bom a ponto de ser o melhor... até que descobri que estar no melhor lugar do mundo não tem absolutamente nada a ver com o chão que meus pés tocam, mas como eu ando sobre esse chão....”

(Luíza Pereira Calumby)

RESUMO

MANTOVANI, A. P. **Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus*.** [Immunological response to equine chorionic gonadotropin (eCG) in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers]. 2010. 92 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente trabalho foi realizado em duas etapas experimentais. O objetivo do Experimento 1 foi avaliar o perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* tratadas uma, duas ou três vezes, com 400 e com 2000UI de eCG. O experimento foi realizado em duas réplicas com o mesmo desenho experimental, porém com padrões raciais distintos. Os animais foram divididos em 6 grupos: os grupos eCG2000UI_1x (n = 5), eCG2000UI_2x (n = 5) e eCG2000UI_3x (n = 5) receberam, respectivamente, um, dois e três tratamentos com 2000 UI de eCG, enquanto os grupos eCG400UI_1x (n = 5), eCG400UI_2x (n = 5) e eCG400UI_3x (n = 5) receberam os mesmos tratamentos porém com 400 UI de eCG. Foram realizadas coletas de sangue semanais por um período de 63 dias, em seguida o intervalo entre as coletas foi de 30 e 60 dias totalizando um período de 300 dias. A dosagem dos anticorpos anti-eCG foi realizada por teste ELISA. O número de tratamentos não influenciou a produção de anticorpos anti-eCG; a produção de anticorpos foi maior em fêmeas *Bos taurus* que em *Bos indicus*, e a aplicação de 2000 UI de eCG resultou em maiores concentrações de anticorpos que a aplicação de 400 UI nos primeiros 21 dias após o tratamento e na resposta tardia. O objetivo do Experimento 2 foi avaliar a memória imunológica celular e humoral de fêmeas *Bos taurus* previamente tratadas com 400 e 2000 UI de eCG, e verificar a influência dessa possível memória imunológica na atividade biológica da molécula de eCG. Além dos animais utilizados no experimento anterior, no Experimento 2 foram incluídos outros nove animais sem tratamento prévio com eCG: eCG2000UI_Controle (n = 5) e eCG400UI_Controle (n = 4). No D0 os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal de progesterona (DIB). Quatro dias mais tarde, as fêmeas dos grupos eCG2000UI_1x, eCG2000UI_2x, eCG2000UI_3x e eCG2000UI_Controle receberam 2000 UI de eCG, enquanto as fêmeas dos grupos eCG400UI_1x, eCG400UI_2x, eCG400UI_3x e eCG400UI_Controle receberam 400 UI de eCG. No momento da retirada do DIB

(D8) os animais receberam $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 1 mg de cipionato de estradiol. Foram realizadas coletas de sangue semanais por 32 dias para dosagem de anticorpos, e duas coletas para avaliação da atividade celular proliferativa no D0 e D32. No momento da retirada do DIB as novilhas foram submetidas a exame ultrassonográfico para avaliação da resposta superestimulatória (no. de folículos > 6 mm) e para mensuração do diâmetro do maior folículo nas fêmeas tratadas com 2000 e 400 UI de eCG, respectivamente. O tratamento prévio não gerou memória imunológica humoral, independente da dose e do número de tratamentos realizados. No entanto, foi observada memória imunológica celular, sendo que esta memória foi maior nos animais submetidos a maior número de tratamentos prévios. Foi observada tendência de efeito de réplica na resposta superestimulatória, e correlação negativa entre a concentração de anticorpos e o número de folículos > 6 mm. O tratamento com 400 UI de eCG não mostrou os mesmos efeitos no diâmetro folicular.

Palavras-chave: eCG. Anticorpo. Resposta imunológica celular. Superovulação. IATF.

ABSTRACT

MANTOVANI, A. P. **Immunological response to equine chorionic gonadotropin (eCG) in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers.** [Resposta imunológica contra a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus*]. 2010. 92 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The present study was carried out in two experimental steps. Experiment 1 was designed to evaluate the anti-eCG antibodies production in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers, in response to 400 and 2000UI of eCG, employed once, twice or three times. This experiment was performed in two identical experimental designs, however, using distinct genetic groups. Animals were randomly divided in six groups: eCG2000UI_1x (n = 5), eCG2000UI_2x (n = 5) and eCG2000UI_3x (n = 5) were respectively treated with one, two and three injections of 2000 UI of eCG. Groups eCG400UI_1x (n = 5), eCG400UI_2x (n = 5) and eCG400UI_3x (n = 5) were submitted to the same treatment protocol aforementioned; however, eCG dose was 400UI. Animals were then submitted to weekly blood sampling during a 63 days period, and then samples were collected within intervals ranging from 30-60 days, totalizing a period of 300 days. Anti-eCG dosage assay was performed by ELISA. Antibody production was not affected by the number of doses; however, was higher in *Bos taurus* females. Moreover, higher antibodies levels in the first 21 days after treatment and in the late response were observed when 2000 UI of eCG was applied. The Experiment 2 was focused on the evaluation of cellular and humoral immunological memory of *Bos Taurus* females previously treated with 400 and 2000 UI of eCG, as well as to figure out influence of the possible immunological response on biological activity of eCG molecule. Besides the animals that were used in the first experiment, nine additional heifers were included in the second trial, which were eCG2000UI_Control (n = 5) and eCG400UI_Control (n = 4). The treatment protocol was: on Day 0 (D0) all heifers received 2 mg of estradiol benzoate and one intravaginal progesterone device (DIB). Four days later, groups eCG2000UI_1x, eCG2000UI_2x, eCG2000UI_3x and eCG2000UI_Control received an injection of 2000 UI eCG, while groups eCG400UI_1x, eCG400UI_2x, eCG400UI_3x and eCG400UI_Control received 400 UI. By the time of DIB withdrawal (D8), animals were treated with PGF_{2α} plus 1 mg of estradiol cypionate treatment. Afterwards,

weekly blood samples were collected during 32 days for antibodies assay. Two additional blood samples were performed on day D0 and D32 to evaluate the cellular proliferative activity in response to eCG. In order to evaluate the ovarian stimulatory response (number of follicles > 6mm) in heifers treated with 2000 UI of eCG as well as the size of the largest follicle in those heifers treated with 400UI, ultrasound examination was carried by the time of DIB withdrawal. Humoral immunological memory response was not observed in animals previously treated with 400 or 2000 UI of eCG, regardless the number of treatments. Otherwise, cellular immunological memory response was observed and was higher in animals subjected to an increased number of treatments. A tendency of replicate effect in follicle numbers (> 6mm) was observed, as well as a high negative correlation between antibodies concentration and the number of follicles > 6mm. Same results were not observed when 400 UI of eCG treatment was performed.

Key-words: eCG. Antibody. Cellular Immunological Response. Superovulation. TAI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação esquemática dos tratamentos realizados em novilhas <i>Bos taurus</i> no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - SP e em novilhas <i>Bos indicus</i> no Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba - SP (2009).....	44
Figura 2	- Intervalo entre as coletas de sangue para dosagem de anticorpos anti-eCG realizadas em novilhas <i>Bos taurus</i> no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - SP; e em novilhas <i>Bos indicus</i> no Polo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba - SP, durante o período experimental (2009 -2010).....	45
Figura 3	- Concentração de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) presente na resposta imunológica inicial de novilhas <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> após tratamento com eCG. (^{a,b} P < 0,05).....	48
Figura 4	- Concentração de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) presente na resposta imunológica inicial de fêmeas tratadas com 400 e 2000 UI de eCG. (^{a,b} P < 0,05).....	49
Figura 5	- Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em novilhas <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia); P < 0,0001.....	50
Figura 6	- Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em resposta ao tratamento com 400 e 2000 UI do referido hormônio (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia); P = 0,0001.....	50
Figura 7	- Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) de acordo com o número de tratamentos utilizados (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia). ^{a,b} P < 0,05.....	51
Figura 8	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com uma única dose de 2000 UI de eCG - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	52
Figura 9	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com uma única dose de 2000 UI de eCG - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	52
Figura 10	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com duas doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	53

Figura 11	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com duas doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias – Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	53
Figura 12	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com três doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	54
Figura 13	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com três doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	54
Figura 14	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com uma única dose de 400 UI de eCG - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	55
Figura 15	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com uma única dose de 400 UI de eCG - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	55
Figura 16	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> com duas doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	56
Figura 17	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com duas doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias – Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	56
Figura 18	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com três doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010).....	57
Figura 19	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas <i>Bos indicus</i> tratadas com três doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010).....	57
Figura 20	- Representação esquemática dos protocolos de sincronização, avaliações ultrassonográficas para mensuração da resposta folicular ao tratamento com diferentes doses de eCG e coletas de sangue para dosagem de anticorpos e para avaliação da proliferação de linfócitos T em novilhas <i>Bos taurus</i> (Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP - 2010).....	68

Figura 21	- Gráficos representativos da forma de análise da resposta proliferativa de linfócitos. (A) Em um primeiro momento foram gerados “dot-plots” com a distribuição das células em relação ao seu tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), nos quais foram delimitadas as regiões de linfócitos (P5). A partir desse gráfico foram gerados novos gráficos nos quais foi analisada a porcentagem de células em proliferação (P1 e P2). Estão representados os seguintes histogramas e “dot-plots” respectivamente: células não estimuladas (B e C); estimuladas com eCG a 1 µg/mL (D e E) ou a 10 µg/mL (F e G) e com ConA a 0,5 µg/mL (H e I).....	71
Figura 22	- Concentração de anticorpos anti-eCG (média ± desvio padrão) em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com 400 UI (n = 19) e 2000 UI de eCG (n = 19). Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010); ^{a,b} P < 0,05.....	72
Figura 23	- Perfil de produção de anticorpos anti-eCG (média ± desvio padrão) em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas pela primeira vez com eCG (n = 9), ou submetidas a um (n = 9), dois (n = 10) ou três (n = 10) tratamentos prévios com o referido hormônio. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010); ^{a,b} P < 0,05	73
Figura 24	- Taxa de proliferação celular em meio de cultura contendo eCG a 10 µg/ml 28 dias após aplicação do referido hormônio. O grupo eCG2000UI_1x tendeu a apresentar maior taxa de proliferação celular que o grupo eCG2000UI_3x (P = 0,06). A atividade celular proliferativa foi maior no grupo eCG2000UI_1x que nos grupos eCG2000UI_2x (P = 0,04) e eCG2000UI_Control (P = 0,0015). A taxa de proliferação celular não diferiu entre os grupos tratados com 400 UI de eCG.....	76
Figura 25	- Correlação entre taxa de proliferação celular e produção de anticorpos anti-eCG (QR) em novilhas <i>Bos taurus</i> . (A) Correlação observada no dia D0 (P < 0,05; r = 0,33). (B) Correlação observada no dia D32 (P < 0,05; r = 0,38).....	76
Figura 26	- Correlação entre a concentração de anticorpos no início do protocolo de sincronização e o número de folículos > 6 mm no dia da retirada do dispositivo de P ₄ em novilhas <i>Bos taurus</i> tratadas com 2000 UI de eCG. (A): 1º protocolo de sincronização (P = 0,43; r = -0,22); (B): 2º protocolo de sincronização (P < 0,05; r ² = 0,71)...	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Taxa de proliferação celular média em novilhas <i>Bos taurus</i> utilizando-se cultivo celular exclusivamente em meio de cultura (SE), em meio de cultura contendo 0,5 µg/ml de ConA, ou contendo eCG a 1 µg/ml ou 10 µg/ml.....	74
Tabela 2	- Efeito do número de tratamentos prévios na taxa de proliferação celular de novilhas <i>Bos taurus</i> em meio de cultura contendo eCG a 10µg/ml. As fêmeas do grupo controle não haviam sido submetidas a nenhum tratamento prévio com eCG no momento da avaliação; já nos animais previamente tratados, a avaliação foi realizada decorrido um ano do último tratamento com eCG.....	75
Tabela 3	- Efeito de réplica no número de folículos > 6 mm em novilhas <i>Bos taurus</i> submetidas a dois tratamentos superestimulatórios consecutivos com o uso de 2000 UI de eCG. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa	77
Tabela 4	- Diâmetro médio do maior folículo (mm) no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P ₄ em novilhas submetidas a dois protocolos consecutivos de sincronização com o uso de 400 UI de eCG. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010)	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	células apresentadoras de antígenos
BE	benzoato de estradiol
BSA	albumina sérica bovina
CFSE	carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CL	corpo lúteo
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CO ₂	gás carbônico
ConA	concanavalina A
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
ELISA	ensaio imunoenzimático ligado a enzima
FHS	hormônio folículo estimulante
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	gravitacional
g	grama
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
i.m.	intramuscular
kDa	kilodalton
Kg	kilograma
LH	hormônio luteinizante
mg	miligrama
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
ml	mililitro
mm	milímetro
MOET	superovulação e transferência de embrião
ng	nanograma
nm	nanômetro
OPD	ortofenilenodiaminobenzida
OPU	<i>ovum pick-up</i>

P	nível de significância
P ₄	progesterona
PBS	tampão fosfato salina
PBS-T	solução tampão fosfato salina adicionado de Tween
PGF _{2α}	prostaglandina
PMSG	gonadotrofina coriônica da égua prenha
QR	quantidade relativa
r	fator de correlação
rpm	rotação por minuto
SOV	superovulação
SSC	<i>Side Scatter</i>
TBS	solução salina tamponada com Tris
TMB	tetrametilbenzidina
TCR	receptores da célula T
TE	transferência de embriões
UI	unidades internacionais
vs	versus
µg	micrograma
µl	microlitro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
®	marca registrada
β	letra grega beta
α	letra grega alpha
=	igual
>	maior
<	menor
≤	menor ou igual
±	mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG).....	25
2.2	O USO DE eCG EM PROGRAMAS DE IATF.....	27
2.3	O USO DE eCG EM PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	31
2.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA PRIMÁRIA E MEMÓRIA IMUNOLÓGICA.....	34
2.5	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A eCG.....	37
EXPERIMENTO 1 – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM NOVILHAS <i>Bos indicus</i> E <i>Bos taurus</i> SUBMETIDAS À TRATAMENTO COM DIFERENTES REPETIÇÕES E DOSES DE eCG.....		40
1	HIPÓTESE.....	40
2	OBJETIVO.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	MANEJO DOS ANIMAIS.....	42
3.2	TRATAMENTOS.....	42
3.3	COLETAS DE SANGUE.....	44
3.4	TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-eCG.....	45
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4	RESULTADOS.....	48
5	DISCUSSÃO.....	58
6	CONCLUSÃO.....	61
EXPERIMENTO 2 – MEMÓRIA IMUNOLÓGICA CELULAR E HUMORAL CONTRA eCG E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA FOLICULAR EM NOVILHAS <i>Bos taurus</i>.....		62
1	HIPÓTESE.....	62
2	OBJETIVOS.....	63
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1	MANEJO DOS ANIMAIS	65
3.2	TRATAMENTOS.....	65
3.3	COLETAS DE SANGUE E AVALIAÇÕES ULTRASONOGRÁFICAS.....	66

3.4	TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS anti-eCG.....	68
3.5	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	68
3.5.1	Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)...	69
3.5.2	Marcação das células com CFSE.....	69
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4	RESULTADOS.....	72
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÃO.....	82
7	IMPLICAÇÕES.....	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) é um hormônio glicoprotéico, sintetizado e secretado pelos cálices endometriais entre o 40º e 130º dia da gestação nas fêmeas equinas (ALLEN, MOOR, 1972; MURPHY, MARTINUK, 1991). É um hormônio de meia-vida longa, composto de duas subunidades (subunidade α e subunidade β), sendo ambas necessárias para a atividade biológica total da molécula (PIERCE, PARSONS, 1981).

A eCG possui a característica peculiar de apresentar atividade tanto de hormônio luteinizante (LH) como de hormônio folículo estimulante (FSH) quando usado em outras espécies que não a espécie eqüina (STEWART, ALLEN, MOOR, 1976). Por esse motivo esse hormônio tem sido amplamente utilizado em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e em programas de superovulação e transferência de embriões (MOET) na espécie bovina.

Nos protocolos de IATF, a utilização da eCG apresenta efeito positivo particularmente em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade, em animais recém-paridos (período pós-parto inferior a 2 meses) e em fêmeas que apresentam comprometimento da condição corporal (BARUSELLI et al., 2004a).

Já em relação aos programas de transferência de embriões, uma vez que é empregada em dose única, a eCG tem se mostrado uma alternativa interessante para facilitar o manejo dos protocolos de superovulação tanto em fêmeas *Bos indicus* como em *Bos taurus*, sem comprometer a produção de embriões (BARUSELLI et al., 2008).

Além disso, o uso de eCG em receptoras tem apresentado efeitos positivos nos protocolos de transferência de embriões em tempo fixo por aumentar a taxa de aproveitamento, concepção e prenhez (BARUSELLI et al., 2000; BÓ et al., 2002).

No entanto, os animais tratados com eCG parecem se tornar refratários à sucessivos tratamentos com o uso dessa molécula (BARUSELLI et al., 2008; JAINUDEEN, 1966). É muito provável que a falta de resposta após o uso contínuo desse hormônio seja mediada pela produção de anticorpos, visto que o alto peso molecular, o elevado nível de glicosilação e sua origem heteróloga fazem da eCG uma

molécula potencialmente imunogênica quando aplicada em bovinos (DRION et al., 2001).

No entanto, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura que avaliam a resposta imunológica ao eCG, e seus possíveis efeitos negativos na resposta folicular de fêmeas bovinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de algumas características da eCG, e seu uso em programas reprodutivos é importante para a compreensão das hipóteses e objetivos desse trabalho, bem como para a discussão dos resultados nas seções que seguirão.

2.1 A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)

Há 80 anos, Cole e Hart (1930) reportaram que o soro proveniente de éguas, em determinados estágios da prenhez, era capaz de promover crescimento ovariano quando aplicado em ratas e camundongas impúberes. Assim, o soro coletado de éguas antes do 37º dia da prenhez não apresentava nenhum efeito nos ovários desses animais, mas já se podia observar uma resposta ovariana pronunciada a partir da aplicação de soro coletado entre o 37º e o 42º dia da gestação, sendo que a estimulação ovariana máxima era observada com a aplicação de soro coletado entre os dias 43 e 80, e podia ser induzida com a aplicação de soro coletado até o 131º dia da gestação.

Mais tarde descobriu-se que o elemento responsável por estimular os ovários das cobaias era a gonadotrofina coriônica da égua preta (PMSG). Atualmente a PMSG é mais conhecida e denominada como eCG e sabe-se que a mesma é secretada nos cálices endometriais de éguas entre os dias 40 e 130 da gestação, aproximadamente (CLEGG, BODA, COLE, 1954; ALLEN, MOOR, 1972; MURPHY, MARTINUK, 1991).

Os cálices endometriais são estruturas temporárias formadas no início do segundo mês da gestação, e correspondem a pequenas protuberâncias de tecido altamente compacto, presentes na porção caudal do corno gravídico e que se desenvolvem devido a uma invasão de células trofoblásticas especializadas para dentro do endométrio materno (ALLEN, HAMILTON, MOOR, 1973; SHARP, 2000).

A eCG parece estar relacionada com o processo de reconhecimento da gestação na espécie equina; processo este que está relacionado com qualquer estratégia utilizada pelas espécies domésticas para garantir que o útero se encontre em um ambiente progestacional adequado para o suporte da gestação e crescimento do feto (ALLEN, 2001).

Assim, após a ovulação, a produção de progesterona pelo corpo lúteo primário continua na égua prenhe até os 35 a 40 dias de gestação, quando então a eCG começa a ser produzida pelos cálices endometriais (MURPHY, MARTINUK, 1991).

A função da molécula de eCG é bastante complexa, de forma que quando administrada a outras espécies apresenta efeitos gonadotróficos tanto de FSH, como de LH (STEWART, ALLEN, MOOR, 1976); enquanto na espécie equina, em associação com as gonadotrofinas da hipófise, estimula a formação de corpos lúteos acessórios através da ovulação ou luteinização dos folículos; o que resulta em aumento de aproximadamente duas vezes na concentração de progesterona sérica aos 40 dias de gestação (ALLEN, 2001; ALLEN et al., 2002).

A eCG é composta de duas subunidades heterogêneas ligadas de maneira não covalente, sendo ambas necessárias para a atividade biológica total da molécula. A subunidade α , comum entre os hormônios de uma mesma espécie, é composta por 96 aminoácidos e duas cadeias de oligossacarídeos, e a subunidade β é composta por 149 aminoácidos e é única para cada hormônio (PIERCE, PARSONS, 1981).

O peso molecular da molécula de eCG é de aproximadamente 45 kDa, sendo 47% de sua estrutura composta por carboidratos. O principal carboidrato da molécula de eCG é a a N-acetil neuramina, ou ácido siálico, primordialmente presente na subunidade β da molécula (COMBARNOUS, SALESSEDRION, GARNIER, 1981¹ apud DRION et al., 2001).

Alguns estudos estabeleceram que a meia-vida da molécula de eCG é de aproximadamente seis dias na espécie eqüina (CATCHPOLE, COLE, PEARSON, 1935²

¹ COMBARNOUS, Y.; SALESSE, R.; GARNIER, J. Physicochemical properties of pregnant mare serum gonatropin. **Biochimica et Biophysica Acta** 667, p. 267 – 276, 1981.

² CATCHPOLE, H.R.; COLE, H.H.; PEARSON, P.G. Studies of the rate of disappearance and fate of mare gonadotropic hormone following intravenous injection. **American Journal of Physiology**, v. 112, p. 21 – 26, 1935.

apud DRION et al., 2001), e de 5 a 15 dias na espécie bovina (MENZER, SCHAMS, 1979), sendo a grande quantidade de ácido siálico, o principal fator responsável por essa longa meia-vida da molécula (MURPHY, MARTINUK, 1991). Outro fator que contribui para a longa meia-vida da eCG é o fato da molécula ser carregada negativamente, já que essa propriedade dificulta sua filtração glomerular e prolonga a presença de altos níveis circulantes da mesma (LEGARDINIER et al., 2005).

Assim, o seu alto peso molecular, elevado nível de glicosilação, origem heteróloga, além de sua longa meia-vida fazem da eCG uma molécula potencialmente imunogênica quando aplicada em bovinos (DRION et al., 2001).

2.2 O USO DE eCG EM PROGRAMAS DE IATF

O uso de eCG tem sido sugerido como uma alternativa para aumentar as taxas de prenhez em vacas de corte no período pós-parto submetidas à protocolos de IATF, já que, devido a sua atividade tanto de FSH como de LH (STEWART, ALLEN, MOOR, 1976), a eCG é capaz de aumentar a taxa de crescimento folicular e a taxa de ovulação.

Os resultados disponíveis na literatura científica indicam que os efeitos positivos da eCG na taxa de concepção de fêmeas bovinas são relevantes apenas em animais com baixa taxa de ciclicidade, em animais paridos e em animais com condição corporal comprometida (Baruselli et al., 2004a).

Assim, em trabalho realizado por Baruselli et al. (2003a) verificou-se que o tratamento com eCG em vacas paridas (75 ± 19 dias pós-parto) apresentou efeito positivo na taxa de concepção dos animais em anestro, enquanto que nos animais cíclicos o mesmo tratamento não apresentou nenhum efeito na taxa de concepção à IATF. Esses resultados foram corroborados em trabalho realizado por Rodriguez et al. (2004), no qual se observou que apenas animais em anestro, ou seja, que apresentavam ausência de corpo lúteo (CL) no início do protocolo, apresentaram efeito

positivo na taxa de concepção devido ao tratamento com eCG [52,2% (47/90) vs 36,5% (27/74)].

A análise retrospectiva de 1984 protocolos de IATF em vacas Nelore mantidas em regime de pasto mostrou que o uso de 400 UI de eCG, no momento da retirada do implante de progesterona, aumentou a taxa de concepção somente em fêmeas que apresentavam baixo escore de condição corporal ($\leq 3,0$) no início do protocolo (BARUSELLI et al., 2004b). Tais resultados estão provavelmente relacionados ao fato da condição corporal estar frequentemente relacionada à ciclicidade.

Recentemente, Sá Filho et al. (2010) observaram aumento na taxa de crescimento folicular e na taxa de ovulação em vacas em anestro tratadas com 400 UI de eCG no momento da retirada do implante de progestágeno. Estudos anteriores realizados por Baruselli et al. (2004c) já haviam demonstrado aumento na taxa de ovulação de novilhas *Bos indicus* tratadas com eCG; nesse experimento apesar da maior taxa de ovulação encontrada nas fêmeas tratadas com eCG (76% - 16/21) que nas fêmeas não tratadas (50% - 10/20) nenhum efeito foi encontrado em relação ao diâmetro do folículo dominante.

Avaliando o efeito do uso de duas doses de eCG (200 UI e 400 UI) na taxa de ovulação, concepção e prenhez de vacas submetidas a protocolos de IATF a base de progesterona (P_4) associados à desmama temporária, Sá Filho et al. (2009) observaram que tanto o tratamento com 200 UI, como com 400 UI de eCG, não aumentou os índices reprodutivos avaliados. Esses resultados sugerem que a desmama temporária provavelmente estimule a liberação dos pulsos de LH de uma maneira que dispensaria o suporte gonadotrófico adicional fornecido pelo tratamento com eCG para a fase final do desenvolvimento folicular.

Por outro lado, em experimento realizado por Meneghetti e Miguel (2008) observou-se tendência ($P = 0,068$) da aplicação de 200 ou 400 UI de eCG em aumentar a taxa de concepção em novilhas cíclicas, submetidas a protocolos de IATF. Esses autores sugeriram que o tratamento com eCG seria capaz de estimular o desenvolvimento final do folículo, que poderia estar inibido durante o protocolo devido à presença de altas concentrações plasmáticas de P_4 nesses animais.

Nesse sentido, Carvalho et al. (2008) demonstraram que altas concentrações de P_4 durante os protocolos de sincronização podiam diminuir a fertilidade em fêmeas bovinas, provavelmente em função de uma diminuição na frequência dos pulsos de LH (ROBERSON et al., 1989) e consequente inibição do desenvolvimento folicular (STOCK, FORTUNE, 1993) durante esses protocolos.

Assim, estratégias que proporcionam o aumento do desenvolvimento folicular após a divergência podem melhorar a fertilidade em fêmeas bovinas submetidas à IATF. Essas estratégias incluem a redução da concentração de progesterona durante os protocolos (MENEQUETTI et al., 2009), a estimulação da liberação de gonadotrofinas endógenas e o tratamento com gonadotrofinas exógenas (SÁ FILHO et al., 2009).

De fato a aplicação de prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) dois dias antes da retirada do dispositivo de P_4 , com o objetivo de diminuir as concentrações plasmáticas desse hormônio no momento em que o folículo torna-se dependente de LH para o seu desenvolvimento, tem se mostrado como uma alternativa interessante na obtenção de melhores resultados nos protocolos de IATF em vacas cíclicas (MENEQUETTI et al., 2009). Da mesma forma, tanto o tratamento com eCG como a desmama temporária, pode aumentar as taxas de prenhez em fêmeas ciclando e em fêmeas em anestro (SÁ FILHO et al., 2009).

De acordo com Peres et al. (2009) a aplicação de eCG pode minimizar qualquer efeito negativo das altas concentrações de P_4 encontradas em novilhas púberes e vacas não lactantes submetidas a protocolos de IATF. No entanto, os resultados encontrados por esses autores mostram que não existe efeito aditivo da aplicação do eCG e da antecipação do tratamento com $PGF_{2\alpha}$ nas taxas de ovulação, concepção e prenhez, e que assim, a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ dois dias antes da retirada do dispositivo seria suficiente para garantir elevadas taxas de concepção.

O uso de eCG em protocolos de IATF também têm sido estudado com o objetivo de antecipar a concepção após o parto em vacas de corte, como demonstrado em trabalho realizado por Penteado et al. (2006), no qual não se observou diferença nas taxas de concepção em vacas Nelore tratadas com eCG e inseminadas artificialmente a

partir de 40 dias pós parto, independentemente do período pós-parto no qual a IATF foi realizada.

Ayres et al. (2007) demonstraram aumento na taxa de concepção de vacas Nelore tratadas com eCG, tanto com baixa como com alta condição de escore corporal no período pós parto precoce (30 a 59 dias). No entanto, nesse estudo, o efeito positivo da eCG em animais com alta condição corporal desapareceu conforme aumentou o período pós parto, sugerindo que o uso de eCG de fato possibilita a obtenção de taxas de concepção satisfatórias em vacas submetidas à IATF no período pós-parto precoce; e que quando a IATF é empregada em um período inferior a 60 dias após o parto, a aplicação de eCG é recomendada em todos os animais independentemente da sua condição corporal.

Dados em literatura associados ao uso de eCG em protocolos de IATF em vacas de leite são raros. Recentemente, Souza et al. (2009) demonstraram que o uso de eCG aumentou a taxa de prenhez em vacas de leite de alta produção, sendo que esse efeito benéfico parece estar limitado a vacas com baixo escore de condição corporal.

Trabalhos prévios com o uso de eCG em vacas de leite apresentam resultados contraditórios. Assim Veneranda et al. (2006) observaram aumento na taxa de concepção de vacas tratadas com eCG quando comparadas com vacas que não receberam o mesmo tratamento (44,9% vs. 30%, respectivamente), no entanto em um experimento seguinte, esses mesmos autores não verificaram aumento significativo na taxa de concepção de animais tratados com eCG (52%) comparado ao grupo controle (41%), apesar da diferença numérica.

Ainda em estudo realizado por Souza et al. (2009), foi observado que o uso de eCG não apresentou efeito no diâmetro do folículo ovulatório, na taxa de ovulação ou no volume do CL presente no diestro subsequente à IATF. No entanto, apesar do volume do CL não ter sido afetado pelo tratamento com eCG, surpreendentemente, o grupo de fêmeas tratadas com eCG apresentou maiores concentrações plasmáticas de P_4 doze dias após a ovulação sincronizada. Desta forma, o aumento na fertilidade de vacas de leite devido ao tratamento com eCG pode estar associado a melhora na capacidade esteroidogênica do CL formado após a ovulação sincronizada em uma fase crítica do desenvolvimento embrionário.

2.3 O USO DE eCG EM PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A indução da ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões é uma biotécnica útil para acelerar o melhoramento genético. Entretanto, a variabilidade da resposta das doadoras de embriões ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas, continua sendo um dos principais fatores limitantes que afetam o sucesso da tecnologia da transferência de embriões em programas de melhoramento genético (ARMSTRONG, 1993; BOLAND, ROCHE, 1993; MAPLETOFT, STEWARD, ADAMS, 2002; BARUSELLI et al., 2006), sendo que esta variação individual em relação à resposta ao tratamento superovulatório tem sido relatada tanto em vacas Nelore (BARUSELLI et al., 2003b) como em vacas Holandesas de alta produção (MARTINS, 2005).

Entre os agentes superovulatórios destacam-se a eCG administrada isoladamente ou associada a soro anti-eCG, o FSH proveniente de extrato de pituitária de suínos, ovinos e equinos, ou ainda o FSH recombinante bovino.

Em 1978, Elsdén, Nelson e Seidel comparando a resposta superovulatória de doadoras tratadas com FSH ou com eCG, na metade do ciclo estral, relataram que fêmeas superestimuladas com FSH apresentavam maior número de CL, bem como maior produção de embriões se comparadas com fêmeas tratadas com eCG. Esses resultados foram posteriormente confirmados por Goulding et al. (1991), em estudo realizado com 200 novilhas tratadas com 24 mg de FSH em 8 doses decrescentes ou com 2000 UI de eCG em dose única.

Alguns autores associaram a inferioridade dos resultados obtidos em tratamento com eCG à presença de folículos de diâmetros aumentados durante o ciclo subsequente ao tratamento superovulatório, antes da coleta dos embriões; já que a presença desses folículos poderia resultar em um ambiente uterino altamente estrogênico, com consequentes efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário inicial (SAUMANDE, 1980).

Mais tarde a presença desses folículos associada com os piores resultados obtidos com o uso de eCG nos protocolos de superestimulação, foi atribuída a

possíveis distúrbios provocados pela eCG durante a fase final do desenvolvimento folicular, que poderia resultar em falhas na ovulação. O embasamento dessa hipótese estava no fato de que, apesar das fêmeas tratadas com eCG apresentarem menor número de ovulações, o número de folículos pré-ovulatórios não diferia entre as fêmeas tratadas com eCG e aquelas submetidas a tratamento com eCG associado a soro anti-eCG (DIELEMAN, BEVERS, 1987).

Assim, a neutralização da eCG com o uso de soro anti-eCG próximo ao estro poderia tanto suprimir os possíveis efeitos deletérios da eCG residual devido ao desenvolvimento de grandes folículos no ciclo subsequente à superovulação, como normalizar o desenvolvimento final do folículo. No entanto, os resultados dos protocolos de superovulação com o uso de eCG associado a soro anti-eCG têm sido bastante controversos (DHONDT et al., 1978; DIELEMAN et al., 1989; GONZALEZ et al., 1994; GOULDING et al., 1996), sendo o momento da aplicação do soro anti-eCG um dos fatores que mais influenciam os resultados desses protocolos (DIELEMAN et al., 1993).

Por outro lado, mais recentemente, Baruselli et al. (2008) reportaram que o uso de eCG para superovulação, associado ao protocolo de sincronização da emergência folicular e da ovulação, tanto em fêmeas *Bos taurus* como em fêmeas *Bos indicus*, tem apresentado resultados satisfatórios quando comparado ao uso do protocolo convencional com FSH em doses decrescentes.

De fato, Martins et al. (2006) trabalhando com doadoras Nelore tratadas com uma única aplicação de 2000 ou 2500 UI de eCG, ou com 100 mg de FSH em 8 doses decrescentes de 12 em 12 horas, não observaram diferença no número de embriões transferíveis entre os tratamentos, apesar da superioridade numérica do grupo tratado com 2000 UI em relação aos demais grupos ($6,9 \pm 1,0$; $4,4 \pm 0,7$ e $4,6 \pm 0,9$; para os grupos eCG-2000UI, eCG-2500UI e FSH-100mg, respectivamente).

Estudos realizados para verificar a viabilidade do uso de 1500 UI de eCG para superovulação de doadoras Nelore mostram resultados variáveis. Assim, em trabalho realizado por Martins et al. (2007) no qual comparou-se a resposta superovulatória de fêmeas tratadas com 133 mg de FSH, 1500 e 2000 UI de eCG foi observada diminuição na produção de embriões com o uso de 1500 UI de eCG em relação aos demais tratamentos. Já em trabalho mais recente (MARTINS et al., 2010), no qual empregou-se

o mesmo delineamento experimental do trabalho anterior, tanto o tratamento com 2000 UI como com 1500 UI de eCG apresentaram a mesma eficiência que o tratamento com FSH, mostrando ser uma alternativa viável para os programas de TE em vacas zebuínas, com vantagens relevantes no manejo das doadoras.

O uso de eCG também mostrou resultados satisfatórios quando comparou-se os resultados do tratamento superovulatório de doadoras Holandesas com 2000 ou 2500 UI de eCG em dose única, ou 200 mg de FSH em 8 doses decrescentes administradas duas vezes ao dia. Esses achados sugerem que a eCG também pode ser utilizada de maneira eficiente nos programas de TE em vacas *Bos taurus* (BARUSELLI et al., 2008).

Com o objetivo de avaliar a eficiência de sucessivos tratamentos superovulatórios com eCG, 10 vacas Nelores foram tratadas com 2000 UI de eCG por quatro vezes consecutivas com intervalo de 35 dias entre os tratamentos, os resultados obtidos foram comparados com o de vacas tratadas simultaneamente com 133 mg de FSH em doses decrescentes. Observou-se que as vacas do grupo eCG produziram quantidades de embriões similares às quantidades produzidas pelas vacas do grupo FSH até o terceiro tratamento; no entanto no quarto tratamento verificou-se uma diminuição significativa no número de embriões produzidos com a utilização do eCG. Quando essas mesmas doadoras foram mais uma vez superovuladas, dessa vez com o uso de FSH, verificou-se que as mesmas voltaram a produzir quantidades de embriões similares às quantidades produzidas pelas doadoras que haviam sido superovuladas com FSH desde o início do experimento (MARTINS et al., 2008³, apud BARUSELLI, et al., 2008).

³ Trabalho não publicado

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA PRIMÁRIA E MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

O sistema imunológico é constituído por células e moléculas que respondem de maneira coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas no organismo, com o objetivo de garantir a integridade e a homeostase do mesmo.

Os mecanismos imunológicos de defesa do organismo contra infecções podem ser classificados em imunidade inata ou inespecífica e imunidade adaptativa ou específica (ABBAS, LICHTMAN, 2004).

A resposta inata é ativada dentro de poucas horas após contato com o antígeno e sua eficácia não aumenta significativamente pela exposição prévia ao antígeno em questão. Ao contrário, os linfócitos da resposta adaptativa, e os anticorpos que eles produzem se tornam efetivos somente dois ou mais dias após o primeiro encontro com um dado antígeno, no entanto persistem como memória imunológica, sendo rapidamente ativados mediante re-exposição ao mesmo estímulo antigênico (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2007).

A resposta adaptativa é mediada pelos linfócitos T e pelos linfócitos B, também chamados de células T e B, respectivamente. A principal função dos linfócitos T é destruir as células infectadas por vírus e ativar outras células do sistema imune incluindo os fagócitos e os linfócitos B, cuja maior função é a produção de anticorpos – proteínas altamente especializadas que reconhecem antígenos e promovem a destruição ou neutralização dos mesmos (ABBAS, LICHTMAN, 2004).

Os linfócitos T, por si só, são incapazes de distinguir os antígenos de qualquer outra molécula própria do organismo; assim as células apresentadoras de antígenos (APC – *Antigen-presenting cells*) são responsáveis por ingerir e digerir os antígenos, fragmentando-os em peptídeos antigênicos, para que parte desses peptídeos se ligue às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), e seja apresentado aos linfócitos T na superfície celular sob a forma de MHC/peptídeo (INABA et al., 1998), onde então são reconhecidos pelos receptores da célula T (TCR).

Enquanto algumas células do sistema imune completam sua diferenciação na medula óssea, outras atingem os estágios de maturação somente após sua entrada na

circulação sanguínea ou nos tecidos. Os linfócitos por sua vez apenas completam sua diferenciação quando do reconhecimento de um antígeno específico; assim linfócitos maduros que ainda não tenham encontrado seu antígeno são chamados de linfócitos *naïve* (ABBAS, LICHTMAN, 2004).

In vivo, a apresentação primária do complexo MHC/peptídeo é realizada exclusivamente pelas células dendríticas na região paracortical dos tecidos linfóides secundários (JENKINS et al., 2001; MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2003). Assim, logo após o reconhecimento de um complexo MHC/peptídeo específico, as células T *naïve* se proliferaram intensamente (GARSIDE et al., 1998), sendo que a magnitude dessa proliferação, também chamada de expansão clonal, é muito maior se o antígeno é administrado juntamente com um adjuvante (KEARNEY et al., 1994).

Após a fase de expansão clonal, as células T *naïve* se diferenciam em células T efectoras, capazes de ativar ou destruir outras células. Assim, as células T podem se enquadrar em duas classes funcionais distintas: as células T citotóxicas, cuja principal função é destruir as células infectadas por vírus ou por bactérias especializadas em colonizar o citoplasma celular, e as células T *helper*, que têm como principal função a ativação de outras células do sistema imune, como os macrófagos e os linfócitos B.

Um importante avanço na identificação desses subgrupos de linfócitos foi a descoberta de que populações de linfócitos funcionalmente distintos expressam diferentes proteínas de membrana. Assim, as células T *helper* expressam em sua superfície de membrana uma proteína denominada CD4, enquanto as células T citotóxicas expressam uma proteína diferente denominada CD8; a presença dessas moléculas de superfície confere às células T *helper* e T citotóxicas, a denominação de células T CD4+ e células T CD8+, respectivamente.

CD4 e CD8 são, respectivamente, co-receptores para moléculas do MHC de classe II e do MHC de classe I e são responsáveis por aumentar a intensidade da ligação entre as células T CD4+ com as células apresentadoras de antígenos, ou da célula CD8+ com as células-alvo, além de facilitar a transdução do sinal mediado por TCR.

Um limiar de afinidade entre o TCR e o complexo MHC/peptídeo é necessário para formação de uma ligação estável entre eles (GRAKOUÏ et al., 1999), assim o

repertório de TCR disponível influencia de maneira significativa o resultado dessa ligação; sendo que a intensidade e a duração do estímulo do TCR por sua vez são fatores extremamente importantes para o grau de diferenciação e desempenho da célula T, bem como para a qualidade da resposta da célula B subsequente (IEZZI, KARJALAINEN, LANZAVECCHIA, 1998)

Uma vez ativadas as células B se dividem vigorosamente, se diferenciam em plasmócitos e passam a secretar altas quantidades de anticorpos, capazes de promover a neutralização dos antígenos, o que leva a destruição dos mesmos por enzimas do sistema complemento ou por fagócitos.

Os anticorpos são a forma solúvel dos receptores de antígenos das células B; assim enquanto as células T agem primariamente através de interações celulares diretas no local da infecção, as células B são capazes de promover uma proteção sistêmica por meio dos anticorpos que são transportados por todo o corpo através da circulação sanguínea ou linfática.

Durante o processo de proliferação celular, algumas células T e B se transformam em células de memória, as quais permanecem na circulação garantindo uma resposta rápida e eficaz contra uma futura exposição ao mesmo antígeno (SPRENT, 1994). Dessa maneira, a eficiência da resposta adaptativa a encontros secundários com um dado antígeno pode ser consideravelmente aumentada através do armazenamento das células de memória, de forma que se tenha um grande clone inicial nos encontros subsequentes (PERELSON, MIRMIRANI, OSTER, 1977; ADA, NOSSAL, 1987).

Quando do reencontro com um determinado antígeno, as células T de memória proliferam mais rapidamente e necessitam de menos co-estimulação do que as células T naïve (COLLE, LeMOAL, TRUFFA-BACHI, 1990; AHMED, 1992). Além disso, como existem muito mais células de memória específicas para um determinado antígeno do que células naïve, um grande número de células efetoras é muito mais rapidamente produzido após um segundo contato com um dado antígeno (GRAY, SPRENT, 1990; GRAY, 1993; MACKAY, 1993).

2.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A eCG

A molécula de eCG possui a propriedade de ser potencialmente imunogênica, essa característica da molécula deve-se principalmente ao seu alto peso molecular, à alta porcentagem de carboidratos presentes na molécula e a sua origem heteróloga (DRION et al., 2001). De fato, o imunomapeamento da eCG com anticorpos monoclonais localizou um grande sítio antigênico; sendo que este inclui o sítio de interação da eCG com os receptores de LH e FSH (CHOPINEAU et al., 1993).

Dessa maneira, a eCG pode induzir a formação de anticorpos pelo organismo quando aplicado em bovinos e em outras espécies, o que pode causar refratariedade ao tratamento com a molécula em questão, e apresentar-se como um motivo de grande preocupação principalmente em programas reprodutivos nos quais a eCG é empregada de maneira repetida e em altas dosagens, como por exemplo em programas de coleta de embrião por meio de superovulação e *ovum pick up* (OPU).

A refratariedade a sucessivos tratamentos com eCG, em altas doses e em curto espaço de tempo, foi demonstrada em trabalho realizado por Jainudeen (1966). Nesse trabalho fêmeas bovinas foram tratadas com quatro aplicações sucessivas de eCG; o intervalo entre a primeira e a segunda aplicação foi de aproximadamente 6 meses, enquanto o intervalo entre as aplicações subseqüentes foi equivalente a duração de dois e um ciclo estral, respectivamente. Dessa maneira, não se observou diminuição da resposta ovariana quando se comparou a resposta ao primeiro e ao segundo tratamento; porém quando a mesma dose foi repetida duas vezes com intervalos variando entre 31 a 40 dias e 18 a 21 dias, a resposta ovariana diminuiu significativamente em termos de presença de corpo lúteo e volume do ovário.

Ainda nesse trabalho, observou-se que a resposta ovariana de ratas impúberes tratadas com eCG poderia ser inibida com a aplicação de soro de vacas tratadas com o mesmo hormônio, e que a mesma inibição não era observada em ratas que recebiam soro de vacas não tratadas; além disso, de maneira geral, essa atividade antagonizadora do soro de vacas previamente tratadas com eCG apresentava

correlação inversa com o número de tratamentos a que a vaca em questão havia sido submetida.

Com base nesses achados, Jainudeen (1966) hipotetizou que a refratariedade às gonadotrofinas exógenas poderia ser mediada por anticorpos; e em 1979, Roser et al. confirmaram a existência de anticorpos anti-gonadotrofinas em éguas submetidas à sucessivos tratamentos com hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana).

Recentemente, Drion et al. (2001) trabalhando com fêmeas bovinas observaram que aplicações semanais de altas doses de eCG podem resultar em produção de anticorpos a partir do terceiro tratamento consecutivo. Porém, a resposta imunológica encontrada nesse trabalho foi bastante variável, com vacas apresentando alta produção de anticorpos e outras apresentando níveis basais durante todo o experimento.

Roy et al. (1999) já haviam descrito essa variabilidade na resposta imune contra a eCG na espécie caprina. Esses autores observaram que tanto fêmeas previamente tratadas, como aquelas que receberam eCG pela primeira vez exibiram perfil similar da resposta imune humoral, exceto pelo fato de que aquelas que haviam sido previamente tratadas apresentaram aumento antecipado na concentração de anticorpos, bem como uma fase de declínio mais prolongada. No entanto, apesar dessa semelhança na resposta imunológica primária e secundária, a concentração de anticorpos anti-eCG diferiu de maneira notável em cada uma das fêmeas do experimento; assim a concentração de anticorpos anti-eCG variou de 0,7 a 102 µg/ml no grupo das cabras tratadas com eCG pela primeira vez; e variou de 3,0 a 219 µg/ml entre as fêmeas previamente tratadas.

Ainda no mesmo trabalho, Roy et al. (1999) investigando cabras submetidas à tratamentos anuais com eCG durante quatro anos consecutivos, mostraram que a baixa ou alta concentração plasmática de anticorpos contra eCG é uma característica inerente de cada indivíduo; e que essa variabilidade na resposta imunológica humoral entre indivíduos pode ser explicada por diferenças no MHC, envolvido na apresentação de antígenos e na regulação da resposta imunológica.

Na prática, o uso repetido de eCG em cabras para indução da ovulação é geralmente seguido de diminuição da fertilidade. Baril, Leboeuf e Saumande (1993) reportaram que a porcentagem de cabras apresentando atraso na manifestação de

estro aumentou de maneira proporcional ao número de tratamentos com eCG, e que cabras que manifestaram cio 30 horas ou mais após a remoção do dispositivo de P₄ mostraram diminuição significativa na taxa de prenhez após IATF. Tal efeito negativo foi ainda mais dramático após a segunda aplicação de eCG dentro da mesma estação reprodutiva (BARIL et al., 1992).

Outros pesquisadores (BODIN et al., 1997), trabalhando com ovelhas sincronizadas com progestágenos e tratadas com 500 a 550 UI de eCG no final do protocolo, descreveram efeito residual deste tratamento com eCG, sendo possível detectar níveis séricos de anticorpos anti-eCG mesmo um ano depois de sua utilização.

Os anticorpos já presentes no momento da aplicação da eCG são definidos como anticorpos residuais, e são os principais responsáveis pelo efeito negativo na fertilidade. Assim, quando a concentração de anticorpos foi mensurada no início do tratamento (dia zero), 10 e 25 dias após a aplicação de eCG, somente a concentração no dia zero apresentou correlação negativa com a fertilidade subsequente. Ao contrário a concentração de anticorpos 10 e 25 dias após o tratamento com eCG não foi um parâmetro significativo (ROY et al., 1999). Resultado semelhante foi encontrado por Baril et al. (1996), que relataram maior taxa de prenhez (66%) em cabras onde a porcentagem de ligação de anticorpos ao eCG antes do tratamento foi menor que 5%, bem como diminuição significativa na taxa de prenhez quando porcentagem dessas ligações se encontrava acima de 10% no mesmo momento (66% vs. 43,5%; $P < 0,01$).

Como mostrado no estudo de Roy et al. (1999), a resposta imune humoral se inicia aproximadamente 7 dias após a aplicação de eCG, portanto os anticorpos recentemente produzidos não poderiam interferir na bioatividade da eCG recém administrado para indução da ovulação; além disso, o fato da concentração de anticorpos mensurada 10 e 25 dias após o tratamento com eCG não mostrar correlação com a fertilidade fortalece ainda mais essa hipótese.

EXPERIMENTO 1 – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM NOVILHAS *Bos indicus* E *Bos taurus* SUBMETIDAS À TRATAMENTO COM DIFERENTES REPETIÇÕES E DOSES DE eCG

1 HIPÓTESE

A aplicação repetida de eCG induz a produção de anticorpos em novilhas bovinas. Essa resposta imunológica humoral contra a eCG se manifesta de maneira similar em fêmeas zebuínas e taurinas. No entanto, é mais pronunciada quando da aplicação de doses mais elevadas, bem como após tratamentos consecutivos.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi mensurar a produção de anticorpos anti-eCG durante um período de 300 dias em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* tratadas com diferentes doses de eCG (400 UI ou 2000 UI) uma única vez, duas vezes consecutivas com intervalo de 30 dias ou três vezes consecutivas com o mesmo intervalo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MANEJO DOS ANIMAIS

Foi utilizado um total de 60 novilhas, sendo 30 da raça Nelore (*Bos indicus*) e 30 das raças Holandesa e Pardo Suíço (*Bos taurus*).

As novilhas *Bos indicus*, que pertenciam ao Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba, apresentavam idade entre 20 e 24 meses e peso médio de $368 \pm 12,9$ kg; enquanto que as novilhas *Bos taurus* apresentavam idade entre 15 a 22 meses, peso médio de $247 \pm 24,8$ kg e pertenciam ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa.

Todos os animais do experimento foram mantidos em regime de pasto, com sal mineral e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela comissão de ética para experimentação animal da Universidade de São Paulo – USP.

3.2 TRATAMENTOS

O experimento foi realizado em duas réplicas com o mesmo desenho experimental, porém usando padrões raciais distintos. Uma das réplicas foi executada no Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba com 30 novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), enquanto a outra foi realizada no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa com 30 novilhas das raças Holandesa e Pardo Suíço (*Bos taurus*).

Em cada uma das réplicas, os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos experimentais. As novilhas do grupo eCG2000UI_1x (n = 5) receberam uma única aplicação de 2000 UI de eCG (Folligon[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil), enquanto as novilhas dos grupos eCG2000UI_2x (n = 5) e eCG2000UI_3x (n = 5)

receberam, respectivamente, duas e três aplicações de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias entre elas. Já os animais dos grupos eCG400UI_1x (n = 5), eCG400UI_2x (n = 5) e eCG400UI_3x (n = 5) foram submetidos à mesma série de tratamentos que os grupos anteriores, no entanto a dose de eCG utilizada nesses animais foi de 400 UI.

Nenhuma das novilhas utilizadas no presente experimento havia sido submetida a qualquer tratamento prévio com eCG.

Para evitar a formação de cistos foliculares e o comprometimento da fertilidade futura das fêmeas utilizadas nesse experimento, a aplicação de eCG não foi realizada de maneira isolada, mas sim dentro de um protocolo hormonal de sincronização. Além disso, para que os tratamentos de todos os grupos finalizassem de maneira concomitante, o tratamento dos grupos que receberam duas e três aplicações de eCG (tanto de 400 como 2000 UI) iniciou, respectivamente, 30 e 60 dias antes do tratamento dos animais que receberam uma única aplicação de eCG.

Dessa maneira no início do experimento (D-64), os animais dos grupos eCG2000UI_3x e eCG400UI_3x receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE – Gonadiol®, Intervet/Schering-Plough, Brasil) por via intramuscular (i.m.) e um dispositivo intravaginal contendo 1 grama de progesterona (DIB®, Intervet/Schering-Plough, Brasil) que foi mantido por oito dias. Quatro dias depois (D-60) realizou-se uma aplicação i.m. de 2000 UI e 400 UI de eCG, nas novilhas dos grupos eCG2000UI_3x e eCG400UI_3x, respectivamente. No momento da retirada do dispositivo todos os animais receberam uma aplicação de um análogo da prostaglandina (150 µg de d-cloprostenol - Veteglan, Hertape Calier Saúde Animal) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer Saúde Animal).

Trinta dias após o início do primeiro protocolo, o tratamento foi repetido nos animais dos grupos eCG2000UI_3x e eCG400UI_3x, e realizado pela primeira vez nos grupos eCG2000UI_2x e eCG400UI_2x; e 30 dias mais tarde, o mesmo protocolo foi realizado em todos os animais de todos os grupos.

O dia da última aplicação de eCG foi considerado como D0 por ter sido tomado como referência para as coletas de sangue que foram realizadas para dosagem de anticorpos contra o referido hormônio. A sequência dos tratamentos hormonais realizados neste experimento, descrita linhas acima, está ilustrada na figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática dos tratamentos realizados em novilhas *Bos taurus* no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - SP e em novilhas *Bos indicus* no Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba – SP (2009)

3.3 COLETAS DE SANGUE

As amostras de sangue para dosagem dos anticorpos foram coletadas da veia caudal em tubos de vácuo com gel separador (Venosafe® Serum Gel, Terumo Europe N.V.) e centrifugadas a 1600 x g por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras de soro obtidas após centrifugação foram imediatamente acondicionadas em tubos de polipropileno devidamente identificados e mantidos à temperatura de – 20°C até o momento da dosagem dos anticorpos.

Em todos os animais, a primeira coleta de sangue foi realizada no início do protocolo hormonal, antes da primeira aplicação de eCG.

Posteriormente, durante os primeiros dois meses, as coletas de sangue foram realizadas semanalmente a partir do sétimo dia da última aplicação de eCG (D0); nos dois meses seguintes as coletas foram realizadas com intervalo de 30 dias; e o intervalo entre as últimas coletas foi de 60 dias, totalizando um período de dez meses, como mostra a figura 2.

Figura 2 - Intervalo entre as coletas de sangue para dosagem de anticorpos anti-eCG realizadas em novilhas *Bos taurus* no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP; e em novilhas *Bos indicus* no Polo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba – SP, durante o período experimental (2009 -2010)

3.4 TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-eCG

A presença de anticorpos anti-eCG na circulação sanguínea dos animais foi realizada por meio de ELISA. Como no mercado não existem “kits” ou anticorpos específicos disponíveis para esse fim, desenvolveu-se, com base em trabalhos que já haviam utilizado a técnica de ELISA para dosagem de anticorpos anti-eCG em fêmeas caprinas (ROY et al., 1999), um método que se mostrou satisfatório para detecção de anticorpos nas amostras utilizadas no presente experimento.

Para o desenvolvimento do ELISA, foram testadas diversas combinações de tampões (PBS, TBS) para cobertura, lavagem (acrescido ou não de Tween 20), diluição

(BSA ou leite desnatado), bloqueio (BSA, leite desnatado e Tween 20) e substrato (OPD e TMB). Assim como diferentes combinações de diferentes concentrações de anticorpos e reagentes secundários, com o intuito de evitar reações inespecíficas e ao mesmo tempo obter um teste capaz de detectar os anticorpos anti-eCG nas amostras (dados não mostrados).

Após essas padronizações chegou-se ao seguinte protocolo: placas de alta afinidade (NUNC – Maxsorb) foram recobertas com 100 µL/cavidade de eCG (Folligon®, Intervet/Schering-Plough, Brasil) a 250 ng/mL diluído em tampão PBS (pH 7,2), e incubadas por uma noite a temperatura ambiente. Após a incubação a placa foi lavada com TBS por duas vezes, com intervalo de 30 segundos entre cada lavagem. As placas foram então bloqueadas com 300 µL/cavidade de PBS-leite desnatado (5%)/Tween20 (0,05%), e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas como descrito acima e foram adicionados 100 µL das amostras de soro diluídas a 1/800 em PBS-leite desnatado 1% (em duplicata) e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 90 minutos.

Após a incubação e nova lavagem (6 vezes), foram adicionados 100 µL de um conjugado anti-IgG bovina-peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído a 1/5000 em PBS-BSA (0,1%) e as placas foram incubadas por mais um período de 60 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foi realizada uma última lavagem (6 vezes) com PBS-T, e adicionado 100 µL/cavidade do substrato/cromógeno (H_2O_2 /TMB - Biolegend), incubando-se a temperatura ambiente por 15 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/cavidade de H_2SO_4 (2N) e a leitura foi feita em leitora de ELISA (BioRad – modelo 680) a 450 nm, com correção a 655 nm.

A avaliação da quantidade de anticorpos anti-eCG nas amostras foi feita de maneira relativa. Para isso em cada uma das placas de reação, foi adicionada (além do branco) uma amostra controle (pool de soros de animais tratados com eCG). As médias de absorbância de cada uma das amostras de sobrenadante (após subtração da absorbância do branco) foram divididas pela média de absorbância da amostra controle

(também subtraída do branco), sendo os resultados expressos então como quantidade relativa (QR).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS (Version 9.1 for Windows, SAS Inst., Cary, NC).

Na análise de variância os dados foram analisados na forma de fatorial 3x2x2, sendo os fatores: repetição dos tratamentos com eCG (1, 2 ou 3 vezes), dose de eCG utilizada (2000 e 4000 UI), grupo genético (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) e da interação entre os fatores.

Para a análise da produção de anticorpos foi utilizado o procedimento estatístico do SAS, Proc Mixed de medidas repetidas no tempo. Como o intervalo entre as coletas aumentou ao longo do período estudado, e considerando-se que a análise estatística deveria ser realizada com intervalos de tempo semelhantes, a análise da produção de anticorpos foi dividida em resposta inicial e resposta tardia. Considerou-se como resposta inicial os primeiros 63 dias após a última aplicação de eCG, onde o intervalo entre as coletas de sangue foi sempre semanal. A análise da resposta tardia foi realizada em períodos bimestrais, assim a produção de anticorpos do primeiro bimestre foi considerada como a média de produção dos primeiros 63 dias, referentes à resposta inicial, e foi usada como referência de comparação para a análise da resposta tardia; a produção de anticorpos do segundo bimestre compreendeu a média da produção de anticorpos dos dias D90 e D120, enquanto o terceiro, quarto e quinto bimestre compreenderam a produção encontrada nos dias D180, D240 e D300, respectivamente.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias (média $\pm$ desvio padrão) dos dados originais. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes.

4 RESULTADOS

No presente experimento, quando se analisou a resposta imunológica inicial ao tratamento com eCG, observou-se efeito de raça ($P = 0,02$) e de dia após o tratamento ($P < 0,0001$), bem como as interações raça x dia ($P < 0,0001$) e dose x dia ($P < 0,0001$).

Não foi observado efeito de número de tratamentos ($P = 0,62$) e da dose de eCG utilizada ($P = 0,13$), bem como as interações repetição x dia ($P = 0,66$), raça x dose ($P = 0,95$), repetição x raça ($P = 0,66$), repetição x dose ($P = 0,80$), raça x dose x dia ($P = 0,25$), repetição x raça x dia ($P = 0,38$), repetição x dose x dia ($P = 0,71$) e repetição x raça x dose x dia ($P = 0,05$).

O perfil de produção de anticorpos diferiu entre fêmeas *Bos taurus* e fêmeas *Bos indicus*; o pico de produção de anticorpos nas fêmeas *Bos indicus* ocorreu no dia D7, enquanto nas fêmeas *Bos taurus* esse pico foi observado mais tardiamente no dia D21, quando a produção de anticorpos das fêmeas *Bos indicus* já se apresentava em fase de declínio. Além disso, as fêmeas *Bos taurus* apresentaram maior produção de anticorpos anti-eCG que as fêmeas *Bos indicus* entre os dias D21 e D56 ($P < 0,05$), porém essa diferença não foi observada entre os dias D-4 e D14, bem como no dia D63 (Figura 3).

Figura 3 – Concentração de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) presente na resposta imunológica inicial de novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* após tratamento com eCG. (^{a,b} $P < 0,05$)

Como descrito anteriormente, houve interação dose de eCG e dia após o tratamento na resposta imunológica inicial à eCG; assim fêmeas tratadas com 2000 UI de eCG apresentaram maior concentração de anticorpos que as fêmeas tratadas com 400 UI entre o 7º e 21º dia após o tratamento. No entanto entre os dias D28 e D63 não foram verificadas diferenças na resposta imunológica de animais tratados com diferentes doses do hormônio (Figura 4).

Figura 4 – Concentração de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) presente na resposta imunológica inicial de fêmeas tratadas com 400 e 2000 UI de eCG. (^{a,b} $P < 0,05$)

Já a análise da resposta imunológica tardia ao eCG mostrou que houve efeito de raça ($P < 0,0001$), dose ($P = 0,0001$) e dia ($P < 0,0001$), bem como da interação número de tratamentos x dia ($P = 0,03$).

Entretanto, não foi observado efeito do número de tratamentos ($P = 0,41$), bem como as interações raça x dia ($P = 0,15$), dose x dia ($P = 0,51$), raça x dose ($P = 0,45$), repetição x raça ($P = 0,12$), repetição x dose ($P = 0,41$), raça x dose x dia ($P = 0,22$), repetição x raça x dia ($P = 0,16$), repetição x dose x dia ($P = 0,38$) e repetição x raça x dose x dia ($P = 0,18$).

Na resposta tardia as fêmeas *Bos taurus* apresentaram maior produção de anticorpos anti-eCG que as fêmeas *Bos indicus* (Figura 5).

Figura 5 – Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia); $P < 0,0001$

Já a comparação das doses utilizadas de eCG, mostrou que o tratamento com 2000 UI de eCG resultou em maior produção de anticorpos quando comparado com o tratamento com 400 UI (Figura 6).

Figura 6 – Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em resposta ao tratamento com 400 e 2000 UI do referido hormônio (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia); $P = 0,0001$

A análise da resposta imunológica tardia mostrou diminuição na produção de anticorpos logo após o final da resposta inicial, assim, verificou-se que o nadir da concentração de anticorpos ocorreu no 3º bimestre, e foi seguida de um aumento nos bimestres seguintes.

Essa diminuição na produção de anticorpos observada logo no início da resposta tardia resultou em menor concentração de anticorpos nos animais tratados por três vezes que nos demais animais no 3º e 4º bimestre; sendo que a concentração de anticorpos entre os grupos voltou a se igualar no 5º bimestre avaliado (Figura 7).

Figura 7 – Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) de acordo com o número de tratamentos utilizados (1º bimestre = Resposta inicial; 2º, 3º, 4º e 5º bimestres = Resposta tardia). ^{a,b} $P < 0,05$

De uma maneira global, a produção de anticorpos anti-eCG mostrou-se bastante variável, com animais dentro de um mesmo grupo apresentando altas concentrações de anticorpos após o tratamento com eCG e outros apresentando níveis basais durante todo o experimento, independente da dose do hormônio utilizada, do número de tratamentos realizados e da sub-espécie tratada. As figuras 8 a 19 mostram o perfil de produção de anticorpos de cada indivíduo dentro de cada um dos grupos.

Figura 8 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* tratadas com uma única dose de 2000 UI de eCG - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 9 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com uma única dose de 2000 UI de eCG - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

Figura 10 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* tratadas com duas doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 11 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com duas doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias – Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

Figura 12 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* tratadas com três doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 13 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com três doses de 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

Figura 14 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* tratadas com uma única dose de 400 UI de eCG - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 15 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com uma única dose de 400 UI de eCG - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

Figura 16 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* com duas doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 17 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com duas doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias – Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

Figura 18 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos taurus* tratadas com três doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP (2009 – 2010)

Figura 19 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG em novilhas *Bos indicus* tratadas com três doses de 400 UI de eCG com intervalo de 30 dias - Pólo Regional de Pesquisa de Pindamonhangaba/SP (2009 – 2010)

5 DISCUSSÃO

Em 1999, Roy et al. demonstraram a presença de anticorpos IgG tanto na resposta imunológica primária como secundária ao eCG. Entretanto, esses mesmos autores reportaram que, em função de uma já conhecida inespecificidade dos testes para detecção das imunoglobulinas da classe IgM, não foi possível detectar a presença dessa classe de anticorpos na resposta imunológica ao eCG. Em função desses achados, somente a presença de anticorpos IgG foi avaliada no presente trabalho.

A variabilidade na resposta imunológica contra a eCG encontrada nesse trabalho já havia sido reportada tanto na espécie bovina (DRION et al., 2001), como em outras espécies (BOURDILLON et al., 1992; ROY et al., 1999). Nesse sentido, Roy et al. (1999) demonstraram correlação significativa entre a presença de determinados alelos em uma região específica do MHC, complexo envolvido na codificação de moléculas de membrana relacionadas com a apresentação de antígenos, e a variabilidade individual na resposta imunológica de fêmeas caprinas ao eCG. Esses achados sugerem que a alta ou baixa produção de anticorpos anti-eCG de fato seja uma característica inerente de cada indivíduo, o que, além de dar suporte à variabilidade da resposta imune ao eCG, pode ser uma possível explicação para a diferença na produção de anticorpos entre novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus* encontrada nesse trabalho.

De fato, trabalhos prévios já haviam demonstrado diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto às características da resposta imunológica contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Piper et al. (2009) demonstraram que, apesar dos *Bos indicus* apresentarem maior resistência à infestação pelo carrapato que os *Bos taurus*, a produção de anticorpos IgG contra extratos antigênicos desse ectoparasita foi maior em *Bos taurus* que em *Bos indicus*. Esses mesmos autores discutem que a intensidade da produção de anticorpos nestas duas subespécies pode variar em função do antígeno do carrapato avaliado. Esses resultados reforçam a hipótese de diferença na resposta imunológica de animais *Bos taurus* e *Bos indicus*; e demonstram ainda que a diferença na resposta imunológica desses animais é dependente do antígeno envolvido na resposta imunológica avaliada.

No entanto, além da suposta diferença na produção de anticorpos entre as subespécies encontrada nesse trabalho deve-se considerar também um possível efeito ambiental, já que as fêmeas *Bos taurus* e as fêmeas *Bos indicus* foram mantidas em locais distintos durante todo o experimento e o sistema imune pode ser influenciado por diversos fatores ambientais e de manejo.

O aumento na concentração dos anticorpos sete dias após a aplicação da eCG encontrado nos animais desse experimento está de acordo com o que foi observado em fêmeas caprinas por Roy et al. (1999), bem como com o que menciona a literatura em relação ao tempo necessário para o desenvolvimento da resposta imunológica, seguida da aplicação de um determinado antígeno. De fato o período necessário para a produção de anticorpos geralmente varia de 24 horas a duas semanas, e parece estar relacionado com a natureza e dose do antígeno, bem como com seu adjuvante e via de administração (AVRAMEAS et al., 1976).

Em contrapartida, Drion et al. (2001), tratando fêmeas bovinas cruzadas com aplicações semanais de 2000 e 1000 UI de eCG, relataram um aumento na concentração de anticorpos mais tardia do que o observado no presente experimento. Esses autores encontraram aumento de anticorpos anti-eCG a partir do 16º e 37º dia em animais tratados somente com 2000 UI de eCG e em animais tratados com doses intercaladas de 2000 e 1000 UI, respectivamente.

De maneira geral, o perfil de produção de anticorpos encontrado nesse experimento foi bastante similar àquele observado em cabras tratadas com 500 UI de eCG (ROY et al., 1999); no entanto, diferiu do perfil observado em fêmeas bovinas tratadas com sucessivas aplicações de altas doses de eCG, tanto em relação ao início da produção de anticorpos como em relação ao pico de produção dos mesmos (DRION et al., 2001).

Em relação à produção de anticorpos frente ao tratamento com diferentes doses de eCG, a aplicação de 2000 UI do hormônio resultou em maior concentração de anticorpos entre o 7º e 21º dia após o tratamento do que a aplicação de 400 UI. Da mesma forma, a resposta tardia ao tratamento com 2000 UI de eCG foi mais pronunciada que a resposta ao tratamento com 400 UI. Esse resultado pode ser

explicado por uma maior intensidade de estímulo do TCR quando da presença de doses mais elevadas do antígeno, o que é um fator extremamente importante para o desempenho das células T e subsequente produção de anticorpos pelas células B (IEZZI; KARJALAINEN; LANZAVECCHIA, 1998).

No presente experimento, o nadir da produção de anticorpos observado na resposta imunológica tardia, aproximadamente no 6º mês após o último tratamento com eCG, foi seguido de aumento na produção de anticorpos nos dois bimestres seguintes; não foi possível encontrar uma explicação plausível para esse resultado.

Da mesma maneira, ao contrário do esperado, tratamentos consecutivos não mostraram influência na concentração de anticorpos presentes na resposta imunológica inicial ao eCG, mais do que isso, foi observada menor concentração de anticorpos no 3º e 4º bimestre da resposta tardia em animais submetidos a três tratamentos consecutivos. Esse achado contradiz o observado por Drion et al. (2001), que reportaram efeito aditivo na produção de anticorpos anti-eCG após tratamentos sucessivos.

O fato de que no trabalho de Drion et al. (2001) as aplicações de eCG foram realizadas semanalmente, simulando a frequência de tratamentos observadas nos programas de OPU, e que no presente experimento as aplicações foram realizadas com intervalo mensal poderia explicar a falta de efeito aditivo entre os sucessivos tratamentos. No entanto, o efeito aditivo de sucessivas aplicações de eCG era esperado como uma justificativa para o resultado encontrado por Martins et al. (2008)⁴, no qual se observou diminuição da resposta superovulatória de vacas mensalmente tratadas com 2000 UI eCG a partir do quarto tratamento consecutivo.

⁴ Trabalho não publicado

6 CONCLUSÃO

A hipótese inicial desse estudo foi parcialmente aceita. De acordo com a hipótese inicial, a aplicação de eCG de fato induz a produção de anticorpos tanto em novilhas *Bos indicus* como em novilhas *Bos taurus*, sendo esta resposta imunológica mais pronunciada quando da aplicação de doses mais elevadas nos primeiros 21 dias após o tratamento, assim como na resposta tardia.

No entanto, a hipótese de que a resposta imunológica ao eCG se manifesta de maneira similar em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* foi rejeitada, assim como a hipótese de que a resposta imunológica é mais pronunciada após tratamentos consecutivos não foi comprovada.

Portanto, os achados desse trabalho são indicativos de que a aplicação de eCG induziu a produção de anticorpos em novilhas bovinas; e que essa resposta imunológica ao eCG não diferiu em função do número de tratamentos. No entanto, a resposta foi mais acentuada em fêmeas taurinas que em fêmeas zebuínas, assim como foi mais acentuada com o uso de 2000 UI do que com o uso de 400 UI de eCG nos primeiros 21 dias após o tratamento, bem como na resposta tardia.

EXPERIMENTO 2 – MEMÓRIA IMUNOLÓGICA CELULAR E HUMORAL CONTRA eCG E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA FOLICULAR EM NOVILHAS *Bos taurus*

1 HIPÓTESE

O tratamento com eCG induz memória imunológica em fêmeas bovinas, o que pode interferir de maneira negativa na atividade biológica da molécula, principalmente quando a administração do referido hormônio é realizado em animais previamente tratados.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse experimento foi avaliar a capacidade da molécula de eCG de induzir memória imunológica, bem como verificar se essa memória imunológica pode influenciar a atividade biológica da referida molécula.

Os objetivos específicos do presente experimento foram:

- Verificar a presença de anticorpos residuais em novilhas *Bos taurus* tratadas com diferentes repetições/doses de eCG, decorrido um ano do último tratamento;
- Avaliar atividade proliferativa de linfócitos T em novilhas *Bos taurus* tratadas com diferentes repetições/doses de eCG, decorrido um ano do último tratamento;
- Comparar o perfil de produção de anticorpos das fêmeas previamente tratadas com diferentes repetições/doses de eCG, quando submetidas a um novo tratamento com 400 ou 2000 UI do referido hormônio, com o de fêmeas submetidas pela primeira vez ao mesmo tratamento;
- Avaliar a atividade proliferativa de linfócitos T 30 dias após o tratamento com 400 ou 2000 UI de eCG em fêmeas previamente tratadas com diferentes repetições/doses de eCG, bem como em fêmeas tratadas pela primeira vez com as mesmas doses do hormônio;
- Comparar a resposta superestimulatória de novilhas previamente tratadas com 2000 UI de eCG por uma, duas ou três vezes com a resposta de fêmeas que ainda não haviam sido tratadas, após dois tratamentos superestimulatórios consecutivos utilizando-se 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias;

- Comparar o diâmetro do maior folículo presente no dia da retirada do dispositivo de P_4 em novilhas previamente tratadas com 400 UI de eCG por uma, duas ou três vezes com o de novilhas que ainda não haviam sido tratadas, após dois protocolos consecutivos de sincronização com o uso de 400 UI de eCG;
- Correlacionar a produção de anticorpos com a taxa de proliferação celular;
- Correlacionar a produção de anticorpos com a atividade biológica da molécula de eCG, correlacionando a concentração de anticorpos com a resposta superestimulatória e com o diâmetro do maior folículo presente no momento da retirada do dispositivo de P_4 no primeiro e no segundo protocolo de sincronização em fêmeas que receberam 2000 e 400 UI de eCG, respectivamente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MANEJO DOS ANIMAIS

O experimento foi conduzido no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, com um total de 38 novilhas *Bos taurus* das raças Holandesa e Pardo Suíço, sendo que desses 38 animais, 29 pertenciam ao experimento anterior.

Todos os animais apresentavam idade entre 27 e 34 meses, peso médio de $289 \pm 38,8\text{kg}$ e foram mantidos em regime de pasto, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela comissão de ética para experimentação animal da Universidade de São Paulo – USP.

3.2 TRATAMENTOS

Os 29 animais que pertenciam ao experimento anterior mantiveram sua identificação de acordo com o tratamento com eCG a que foram previamente submetidos um ano antes do início desta segunda etapa do trabalho.

Assim, o grupo eCG2000UI_1x (n = 4) havia recebido um único tratamento com 2000UI de eCG, enquanto os grupos eCG2000_2x (n = 5) e eCG2000_3x (n = 5) haviam sido submetidos respectivamente a dois e três tratamentos com 2000 UI de eCG com intervalo de 30 dias; os grupos eCG400UI_1x (n = 5), eCG400UI_2x (n = 5) e eCG400UI_3x (n = 5) haviam sido submetidos ao mesmo esquema de tratamento dos grupos anteriores, no entanto a dose de eCG utilizada nesses grupos foi de 400 UI.

Além desses animais, foram utilizados nesse experimento outros nove animais que nunca haviam sido anteriormente tratados com eCG. Esses animais foram

aleatoriamente divididos em dois grupos: eCG2000UI_Controle (n = 5) e eCG400UI_Controle (n = 4).

Todos os animais, exceto quatro fêmeas que pertenciam ao experimento anterior e ficaram prenhes, foram submetidos a um protocolo de sincronização similar ao realizado no Experimento 1.

Assim no D0 esses animais receberam 2 mg de BE por via i.m. e um dispositivo intravaginal de P₄ que foi mantido por 8 dias. Quatro dias mais tarde, as fêmeas dos grupos eCG2000UI_1x, eCG2000UI_2x, eCG2000UI_3x e eCG2000UI_Controle receberam uma aplicação de 2000 UI de eCG, enquanto as fêmeas dos grupos eCG400UI_1x, eCG400UI_2x, eCG400UI_3x e eCG400UI_Controle receberam uma aplicação de 400 UI de eCG. No momento da retirada do dispositivo todos os animais receberam uma aplicação de um análogo da prostaglandina e 1 mg de cipionato de estradiol.

O mesmo protocolo foi repetido um mês mais tarde nos mesmos animais.

Das fêmeas que ficaram prenhes, uma pertencia ao grupo eCG200UI_1x e as outras três pertenciam ao grupo eCG2000UI_3x; como anteriormente mencionado essas fêmeas não foram submetidas ao protocolo de sincronização descrito acima, no entanto receberam 2000 UI de eCG no mesmo dia em que a aplicação de eCG foi realizada nas demais fêmeas do experimento (D4 e D36).

3.3 COLETAS DE SANGUE E AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Todas as amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal, sendo que as amostras para dosagem de anticorpos foram coletadas em tubos de vácuo (Venosafe[®] Serum Gel, Terumo Europe N.V.); enquanto as amostras de sangue para avaliação da proliferação de linfócitos foram coletadas em tubos de vácuo com heparina sódica (BD Vacutainer[®] Plus, BD Diagnostics, São Paulo) utilizando-se técnica asséptica.

A primeira coleta de sangue para avaliação do perfil de produção de anticorpos foi realizada no D0, e posteriormente foram realizadas coletas semanais a contar da aplicação do eCG (D4), coincidindo a data da última coleta com o início do segundo protocolo de sincronização (D32).

Após coleta, as amostras de sangue para dosagem de anticorpos foram centrifugadas a 1600 x g por 20 minutos em temperatura ambiente, e as amostras de soro obtidas após centrifugação foram imediatamente acondicionadas em tubos de polipropileno devidamente identificados e mantidas em temperatura de -20°C até o momento da dosagem dos anticorpos.

Já as coletas de sangue para avaliação da proliferação de linfócitos foram realizadas concomitantemente ao início do primeiro (D0) e do segundo (D32) protocolo de sincronização a que essas fêmeas foram submetidas. Essas coletas de sangue foram realizadas inclusive nas fêmeas que ficaram prenhes e que, por consequência, não foram submetidas ao protocolo de sincronização e receberam a aplicação de eCG de maneira isolada.

As amostras obtidas para avaliação da proliferação de linfócitos foram processadas imediatamente após a coleta no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foram realizadas avaliações ultrassonográficas para avaliação da resposta superestimulatória nas fêmeas tratadas com 2000 UI, e para determinação do diâmetro do maior folículo nas fêmeas tratadas com 400 UI de eCG, no momento da retirada do dispositivo de P₄ do primeiro (D8) e do segundo protocolo de sincronização (D40).

Essas avaliações foram realizadas sempre pelo mesmo operador com o auxílio de um aparelho de ultra-som (CTS-3300V, SIUI, China equipado com probe linear transretal de frequência 7,5MHz), e não foram realizadas nas fêmeas prenhas.

O delineamento do Experimento 2 está resumidamente representado na figura 20.

Figura 20 - Representação esquemática dos protocolos de sincronização, avaliações ultrassonográficas para mensuração da resposta folicular ao tratamento com diferentes doses de eCG e coletas de sangue para dosagem de anticorpos e para avaliação da proliferação de linfócitos T em novilhas *Bos taurus* (Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP - 2010)

3.4 TESTE ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-eCG

A presença de anticorpos anti-eCG na circulação sanguínea dos animais foi realizada por meio de ELISA, seguindo exatamente o mesmo procedimento realizado na primeira etapa desse trabalho.

3.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A análise da atividade celular proliferativa foi realizada para avaliar a capacidade da molécula de eCG em gerar memória imunológica.

3.5.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleares foram separadas do sangue periférico por meio de gradiente de Ficoll-Hypaque. Assim, após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de 15 mL contendo uma solução de Ficoll-Hypaque (5 mL) e centrifugado a 2300 rpm durante 30 minutos. A fração contendo as CMSP foi coletada e as células submetidas a duas lavagens com PBS (1250 rpm, por 10 minutos a 4°C). As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI e contadas em câmara de Neubauer.

3.5.2 Marcação das células com CFSE

As células mononucleares de sangue periférico foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas durante 5 minutos com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) – em uma concentração final de 5 M/mL, e a seguir a reação foi interrompida pela adição de solução contendo soro fetal bovino (RPMI-SBF 10%). As células foram centrifugadas a 1250 rpm durante 10 minutos, ressuspensas em PBS e novamente centrifugadas (1250 rpm por 10 minutos a 4°C).

Após a marcação, as células foram utilizadas para avaliar a atividade proliferativa em resposta a estímulos com o mitógeno concanavalina A (ConA – 0,5 µg/mL), e com eCG (Folligon[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil) em duas concentrações (1 µg/mL e 10 µg/mL). Para isso, as CMSP foram ressuspensas em uma concentração de 2×10^6 /mL e plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/cavidade), os estímulos foram adicionados e o volume final completado para 200 µL.

As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 5 dias. Após o período de incubação as células foram coletadas, transferidas para tubos apropriados e lavadas com tampão PBS-BSA 1% (1250 rpm a 4°C por 10 minutos). Após a lavagem o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de células ressuspensado em tampão de fixação (PBS-formaldeído 2%).

Após a transferência para tubos apropriados, a leitura foi feita em citômetro de fluxo (FACScanto II/Becton & Dickson). Para cada amostra um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos. A análise dos resultados foi executada em programa específico (FSC Express v.3.00.0320 – De Novo Software).

A taxa de proliferação foi avaliada de acordo com a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE obtida em cada amostra, conforme exemplificado na figura 21.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS (Version 9.1 for Windows, SAS Inst., Cary, NC).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias.

A análise de proliferação celular foi realizada utilizando-se o procedimento GLM, e a comparação das médias foi realizada através do teste de Tukey. Na análise de variância os dados foram analisados através de um fatorial 4 x 2, sendo os fatores: número de tratamentos prévios com eCG (0, 1, 2 ou 3 tratamentos prévios), dose de eCG utilizada (2000 e 4000 UI) e da interação entre os fatores.

A comparação do número de folículos maiores que 6 mm nas fêmeas tratadas com 2000 UI de eCG e do tamanho do maior folículo nas fêmeas tratadas com 400 UI de eCG foi realizada com o uso de medidas repetidas no tempo pelo procedimento GLIMMIX; sendo que os resultados de número de folículos maiores que 6 mm foram transformados em raiz quadrada para atingir a normalidade.

As correlações entre taxa de proliferação celular e concentração de anticorpos, concentração de anticorpos e diâmetro do maior folículo, bem como concentração de anticorpos e número de folículos > 6 mm foram analisadas com o proc CORR do SAS. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências.

Figura 21 - Gráficos representativos da forma de análise da resposta proliferativa de linfócitos. (A) Em um primeiro momento foram gerados “dot-plots” com a distribuição das células em relação ao seu tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), nos quais foram delimitadas as regiões de linfócitos (P5). A partir desse gráfico foram gerados novos gráficos nos quais foi analisada a porcentagem de células em proliferação (P1 e P2). Estão representados os seguintes histogramas e “dot-plots” respectivamente: células não estimuladas (B e C); estimuladas com eCG a 1 µg/mL (D e E) ou a 10 µg/mL (F e G) e com ConA a 0,5 µg/mL (H e I)

4 RESULTADOS

A análise do perfil de produção de anticorpos após tratamento com 400 e 2000 UI de eCG em novilhas previamente tratadas e em novilhas que nunca haviam sido tratadas com eCG, mostrou efeito de dia após o tratamento ($P < 0,0001$), de dose ($P = 0,0002$), bem como as interações dia x dose ($P = 0,002$) e dia x número de tratamentos prévios ($P < 0,0001$).

Não foi observada presença de anticorpos residuais anti-eCG em novilhas *Bos taurus*, decorrido um ano do último tratamento com eCG. Assim, no D0, não foi observada diferença na concentração de anticorpos entre animais que nunca haviam sido tratados com eCG e em animais previamente tratados, independente do número de tratamentos prévios ($P = 0,70$) e da dose de eCG utilizada ($P = 0,17$).

A produção de anticorpos se mostrou mais acentuada nos animais tratados com 2000 UI de eCG do que naqueles tratados com 400 UI, independente do número de tratamentos prévios recebidos (Figura 22).

Figura 22 – Concentração de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em novilhas *Bos taurus* tratadas com 400 UI ($n = 19$) e 2000 UI de eCG ($n = 19$). Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010); ^{a,b} $P < 0,05$

Além disso, novilhas que nunca haviam sido anteriormente tratadas com eCG apresentaram maior produção de anticorpos que as novilhas previamente tratadas nos dias D18 ($P < 0,0001$) e D25 ($P = 0,01$), independente do número de tratamentos a que as mesmas haviam sido submetidas.

Já no dia D32, observou-se um aumento na produção de anticorpos das fêmeas que haviam sido tratadas por uma e duas vezes, de maneira que nesse dia a concentração de anticorpos nas novilhas que ainda não haviam sido tratadas com eCG foi maior que nas novilhas que haviam sido tratadas por três vezes ($P = 0,01$), mas não diferiu da produção daquelas que haviam sido tratadas por uma ($P = 0,40$) e duas vezes ($P = 0,33$). A concentração de anticorpos nas fêmeas previamente tratadas uma única vez foi maior que nas fêmeas previamente tratadas por três vezes ($P = ,001$; Figura 23).

Figura 23 - Perfil de produção de anticorpos anti-eCG (média $\pm$ desvio padrão) em novilhas *Bos taurus* tratadas pela primeira vez com eCG ($n = 9$), ou submetidas a um ($n = 9$), dois ($n = 10$) ou três ($n = 10$) tratamentos prévios com o referido hormônio. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010); ^{a,b} $P < 0,05$

A avaliação da resposta imune celular de novilhas previamente tratadas com eCG e de novilhas que não haviam sido anteriormente tratadas foi realizada por meio

de análise da atividade celular proliferativa. Para tanto foi analisada a taxa de proliferação de linfócitos em cultivo exclusivamente em meio de cultura (sem estímulo), em meio de cultura contendo o mitógeno ConA a 0,5 µg/ml ou em meio de cultura contendo eCG a 1 µg/ml ou 10 µg/ml.

Essa avaliação mostrou maior taxa de proliferação celular quando se utilizou cultivo em meio de cultura contendo ConA quando comparado com o cultivo em qualquer outro meio de cultura. O cultivo na ausência de estímulo apresentou menor taxa de proliferação celular quando comparado com o cultivo em meio de cultura contendo eCG a 10 µg/ml ($P < 0,0001$); no entanto não diferiu do cultivo em meio de cultura contendo eCG a 1 µg/ml (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de proliferação celular média em novilhas *Bos taurus* utilizando-se cultivo celular exclusivamente em meio de cultura (SE), em meio de cultura contendo 0,5 µg/ml de ConA, ou contendo eCG a 1 µg/ml ou 10 µg/ml

	Condições de Cultivo			
	SE (%)	eCG 1µg/ml (%)	eCG 10µg/ml (%)	ConA 0,5µg/ml (%)
Primeira Coleta	3,10 ^c	3,17 ^c	5,95 ^b	79,8 ^a
Segunda Coleta	4,76 ^c	6,21 ^c	11,94 ^b	-

^{a,b,c} Médias diferem estatisticamente; $P < 0,0001$

Como a proliferação celular utilizando-se cultivo em meio de cultura contendo eCG a 1 µg/ml não mostrou diferença em relação a proliferação obtida exclusivamente em meio de cultura, a avaliação da resposta imunológica celular ao eCG foi realizada utilizando-se como referência somente os resultados do cultivo em meio de cultura contendo eCG a 10 µg/ml.

Dessa maneira, passado um ano do último tratamento com eCG, a análise da atividade celular proliferativa mostrou efeito do número de tratamentos prévios ($P = 0,002$) e do estímulo utilizado ($P = 0,0002$).

A taxa de proliferação de linfócitos foi significativamente maior em meio de cultura contendo eCG a 10 µg/ml do que na ausência de estímulo.

A atividade celular proliferativa em meio de cultura contendo 10 µg/ml de eCG não apresentou diferença entre animais que haviam sido tratados por uma única vez ou

por duas vezes consecutivas; no entanto, estes animais apresentaram maior taxa de proliferação celular que aqueles que não haviam sido previamente tratados com eCG. Além disso, as fêmeas que haviam sido tratadas por três vezes apresentaram maior taxa de proliferação celular que todos os demais grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito do número de tratamentos prévios na taxa de proliferação celular de novilhas *Bos taurus* em meio de cultura contendo eCG a 10µg/ml. As fêmeas do grupo controle não haviam sido submetidas a nenhum tratamento prévio com eCG no momento da avaliação; já nos animais previamente tratados, a avaliação foi realizada decorrido um ano do último tratamento com eCG

Número de tratamentos prévios com eCG	n	Taxa de proliferação celular (%)
Controle (Sem tratamento prévio com eCG)	09	2,69 ^c
1 Tratamento Prévio com eCG	09	3,75 ^b
2 Tratamentos Prévios com eCG	10	4,89 ^b
3 Tratamentos Prévios com eCG	10	6,52 ^a

^{a,b} Médias diferem estatisticamente; P < 0,05

Com o objetivo de verificar a atividade imunológica celular seguida de um período mais curto da exposição à eCG, a taxa de proliferação celular, em meio de cultura contendo eCG a 10 µg/ml, foi avaliada 28 dias após aplicação de 400 ou 2000 UI de eCG. Essa avaliação foi realizada tanto em fêmeas que até então nunca haviam sido submetidas a tratamento com o hormônio em questão, como em fêmeas previamente tratadas.

Essa análise não mostrou efeito de dose (P = 0,16) e de número de tratamentos prévios (P = 0,16). No entanto foi observada efeito de interação número de tratamentos x dose (P = 0,02).

Dessa maneira, não foi observada diferença na taxa de proliferação celular entre os grupos tratados com 400 UI de eCG independente do número de tratamentos prévios realizados. Entretanto, 28 dias após a aplicação de eCG, o grupo eCG2000UI_1x somente tendeu a apresentar maior taxa de proliferação celular que o grupo eCG2000UI_3x (P = 0,06), no entanto mostrou maior atividade celular proliferativa que o grupo eCG2000UI_2x (P = 0,04) e que o grupo eCG2000UI_Controle

($P = 0,0015$). Da mesma forma, o grupo eCG2000UI_1x apresentou maior taxa de proliferação celular que o grupo eCG400UI_1x (Figura 24).

Figura 24 – Taxa de proliferação celular em meio de cultura contendo eCG a 10 $\mu\text{g/ml}$ 28 dias após aplicação do referido hormônio. O grupo eCG2000UI_1x tendeu a apresentar maior taxa de proliferação celular que o grupo eCG2000UI_3x ($P = 0,06$). A atividade celular proliferativa foi maior no grupo eCG2000UI_1x que nos grupos eCG2000UI_2x ($P = 0,04$) e eCG2000UI_Control ($P = 0,0015$). A taxa de proliferação celular não diferiu entre os grupos tratados com 400 UI de eCG

Os resultados apresentados na figura 25 mostram uma correlação positiva entre a taxa de proliferação celular e a produção de anticorpos tanto no D0 ($P < 0,05$; $r = 0,33$) como no D32 ($P < 0,05$; $r = 0,38$).

Figura 25 – Correlação entre taxa de proliferação celular e produção de anticorpos anti-eCG (QR) em novilhas *Bos taurus*. (A) Correlação observada no dia D0 ($P < 0,05$; $r = 0,33$). (B) Correlação observada no dia D32 ($P < 0,05$; $r = 0,38$)

Para avaliação da resposta folicular dos animais frente a diferentes tratamentos com eCG, foi realizado exame ultrassonográfico no dia da retirada do dispositivo

intravaginal de P₄ em dois protocolos de sincronização consecutivos (1º réplica/2º réplica - intervalo de 30 dias) para avaliação da resposta superestimulatória nos animais tratados com 2000 UI, e para mensuração do diâmetro do maior folículo nos animais tratados com 400 UI.

A análise do número de folículos > 6 mm nos animais submetidos à aplicação de 2000 UI de eCG não mostrou efeito significativo do número de tratamentos prévios (eCG2000UI_Controle = $13,7 \pm 2,39$, eCG2000UI_1x = $10,32 \pm 2,68$, eCG2000UI_2x = $7,86 \pm 2,66$, eCG2000UI_3x = $12,66 \pm 3,77$; P = 0,48), bem como de interação entre número de tratamentos prévios x réplica (P = 0,38). No entanto, foi observada tendência de efeito réplica (P = 0,10), com redução no número de folículos maiores que 6 mm no 2º tratamento (1º tratamento = $12,72 \pm 1,76$; 2º tratamento = $9,44 \pm 1,69$; Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito de réplica no número de folículos > 6 mm em novilhas *Bos taurus* submetidas a dois tratamentos superestimulatórios consecutivos com o uso de 2000 UI de eCG. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa

	n	Número de folículos > 6 mm
1º tratamento	15	$12,72 \pm 1,75^A$
2º tratamento	15	$9,44 \pm 1,69^B$

^{A,B} Médias tenderam a ser diferentes estatisticamente; P = 0,10

Já na análise do diâmetro do maior folículo presente no momento da retirada do dispositivo de P₄ não houve efeito do número de tratamentos prévios (P = 0,71), nem efeito de réplica (P = 0,96), no entanto foi observada interação entre número de tratamentos prévios x réplica (P = 0,02; Tabela 04).

Tabela 4 - Diâmetro médio do maior folículo (mm) no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P₄ em novilhas submetidas a dois protocolos consecutivos de sincronização com o uso de 400 UI de eCG. Instituto de Zootecnia de Nova Odessa (2010)

	eCG400UI_1x	eCG400UI_2x	eCG400UI_3x	eCG400UI_Controle
1º tratamento	$13,20 \pm 1,69$	$12,20 \pm 1,69$	$14,5 \pm 1,89$	$9,00 \pm 1,89$
2º tratamento	$13,18 \pm 0,90$	$11,92 \pm 0,90$	$10,26 \pm 1,00$	$13,37 \pm 1,12$
	P = 0,98	P = 0,85	P = 0,02	P = 0,02

Verificou-se que os diâmetros foliculares médios não diferiram entre o primeiro e o segundo tratamento para os animais previamente tratados por uma ou duas vezes.

Entretanto, para animais previamente tratados por três vezes observou-se diminuição do diâmetro do maior folículo no segundo tratamento, enquanto para os animais que nunca haviam sido previamente tratados ocorreu aumento do diâmetro folicular no segundo tratamento.

No presente trabalho foi observada uma correlação negativa entre a concentração de anticorpos no D32 (início do 2º protocolo de sincronização) e o número de folículos > 6 mm no dia da retirada do dispositivo de P₄ ($P < 0,05$; $r = -0,71$). Resultado similar não foi observado, correlacionando-se a concentração de anticorpos no dia D0 (início do 1º protocolo de sincronização) e o número de folículos > 6 mm no dia D8 ($P = 0,43$; $r = -0,22$; Figura 26).

Figura 26 – Correlação entre a concentração de anticorpos no início do protocolo de sincronização e o número de folículos > 6 mm no dia da retirada do dispositivo de P₄ em novilhas *Bos taurus* tratadas com 2000 UI de eCG. (A): 1º protocolo de sincronização ($P = 0,43$; $r = -0,22$); (B): 2º protocolo de sincronização ($P < 0,05$; $r^2 = 0,71$)

Da mesma maneira, não foi possível observar correlação entre a concentração de anticorpos e o diâmetro máximo do folículo no dia da retirada do dispositivo de P₄, tanto no primeiro ($P = 0,75$; $r = 0,08$) como no segundo tratamento ($P = 0,19$; $r = 0,36$).

5 DISCUSSÃO

Ao contrário do esperado, um ano após tratamento com eCG não foi possível detectar a presença de anticorpos residuais em fêmeas *Bos taurus*, tanto em novilhas que haviam sido submetidas a tratamento prévio com 400 como com 2000 UI de eCG, independente do número de tratamentos realizados.

Este resultado está em desacordo com trabalho realizado por Bodin et al. (1997), que detectaram níveis séricos de anticorpos anti-eCG em ovelhas mesmo um ano após o tratamento. Em fêmeas caprinas tratadas com eCG uma vez ao ano durante quatro anos consecutivos, também foi possível observar a presença de anticorpos residuais um ano após o tratamento com eCG, sendo que a concentração desses anticorpos residuais aumentou em função do número de tratamentos prévios a que as fêmeas haviam sido submetidas (ROY et al., 1999).

Surpreendentemente, tanto após aplicação de 400 como de 2000 UI de eCG, a resposta imune humoral de fêmeas que não haviam sido previamente tratadas foi mais pronunciada que a de fêmeas que já haviam sido expostas ao hormônio. Não foi possível encontrar uma explicação plausível para esse resultado, uma vez que normalmente se espera maior eficiência da resposta imunológica ao contato secundário com um antígeno, devido ao armazenamento de células de memória após o primeiro contato que permite um grande clone inicial nos encontros subseqüentes, levando a uma maior magnitude na produção de anticorpos (ABBAS; LITCHMAN, 1994).

Em oposição aos resultados encontrados no presente trabalho, Roy et al. (1999) reportaram que a cinética de produção de anticorpos anti-eCG em cabras previamente tratadas é marcada por um aumento mais precoce na produção, bem como por uma fase de declínio mais longa que as fêmeas tratadas pela primeira vez.

No presente trabalho, a alta taxa de proliferação celular quando do estímulo com ConA, mostra que os animais não se apresentavam imunossuprimidos durante o período experimental.

Além disso, o fato da taxa de proliferação celular em meio de cultura contendo eCG à concentração de 1 µg/ml não ter sido diferente da taxa de proliferação

exclusivamente em meio de cultura, mostra que essa concentração de eCG não foi suficiente para estimular a proliferação das células. Por outro lado, o aumento na taxa de proliferação celular em meio contendo eCG a 10 µg/ml quando comparada com a proliferação exclusivamente em meio de cultura, mostra que de fato o estímulo com eCG nessa concentração foi eficiente em promover a proliferação das células.

Assim, ao contrário do que foi observado em relação à memória imunológica humoral, a aplicação de eCG gerou resposta imunológica celular, sendo que esta memória pôde ser observada mesmo um ano após o tratamento com eCG. Essa memória imunológica celular ao eCG, quando avaliada um ano após o último tratamento, parece ser dependente do número de tratamentos prévios a que o animal foi submetido, já que a atividade celular proliferativa foi mais intensa nos animais que haviam sido submetidos a três tratamentos consecutivos que nos animais que haviam sido tratados por duas vezes ou uma única vez; enquanto esses últimos ainda apresentaram maior taxa de proliferação celular que os animais não tratados.

A resposta imunológica celular 28 dias após o tratamento com eCG parece ser mais intensa que a resposta observada após um ano do tratamento. Essa resposta foi mais pronunciada nos animais submetidos à aplicação de 2000 UI de eCG e que haviam sido previamente tratados por uma única vez. Frente a esse resultado, não foi possível concluir se a atividade celular proliferativa, após um período de exposição mais curto ao eCG, está relacionada somente com a dose do hormônio utilizada ou também com o número de tratamentos prévios.

A correlação entre a concentração de anticorpos e a taxa de proliferação celular encontrada era esperada. Isso porque a produção de anticorpos pelos linfócitos B é dependente de uma fase de proliferação celular prévia, que envolve tanto a proliferação de células T *helper*, cuja principal função é a ativação de outras células do sistema imune, entre elas os próprios linfócitos B; como a proliferação dos próprios linfócitos B, que após ativação se multiplicam e se diferenciam em plasmócitos, para então produzirem os anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2004).

O grupo que havia sido previamente tratado por três vezes apresentou diminuição do diâmetro do maior folículo após o 2º protocolo de sincronização. Pelo delineamento experimental proposto não foi possível encontrar uma explicação

plausível para esse resultado, principalmente quando se considera que justamente o grupo que não havia sido previamente tratado apresentou maior concentração de anticorpos após aplicação de eCG e ainda apresentou aumento no diâmetro do folículo após o 2º tratamento.

Esses achados, associados ao fato de que a concentração de anticorpos não apresentou correlação com o diâmetro do maior folículo, sugerem que a quantidade de anticorpos produzida em resposta ao uso de eCG em baixas doses não influencia a atividade biológica da molécula.

Já em relação às novilhas tratadas com 2000 UI de eCG, não foi observada diferença na resposta superestimulatória em função do número de tratamentos prévios a que as fêmeas haviam sido submetidas. No entanto, foi observada tendência de diminuição do número de folículos > 6 mm no segundo tratamento consecutivo realizado com um intervalo de 30 dias. De acordo com Baruselli et al. (2008), após o primeiro tratamento superestimulatório normalmente se observa diminuição da resposta ovariana aos tratamentos superestimulatórios subseqüentes, independente da gonadotrofina utilizada. Esse fato por si só, poderia sugerir que a diminuição no número de folículos após o segundo tratamento com eCG ocorreu devido à sequência de tratamentos superestimulatórios; no entanto, a alta correlação negativa entre a concentração de anticorpos no início do segundo protocolo de sincronização e o número de folículos > 6 mm indicam que a diminuição da resposta ao segundo tratamento superestimulatório pode também ter sofrido influência da produção de anticorpos anti-eCG.

A correlação negativa entre a concentração de anticorpos e o número de folículos > 6 mm foi observada somente no segundo tratamento quando a concentração de anticorpos já havia aumentado em resposta ao tratamento anterior; essa correlação pode não ter sido observada no primeiro tratamento devido ao fato da concentração de anticorpos apresentar-se em níveis basais.

6 CONCLUSÃO

A hipótese desse trabalho foi parcialmente aceita.

Assim, observou-se que o tratamento com eCG, independente da dose e do número de tratamentos realizados, não induz memória imunológica humoral, já que não foi observada a presença de anticorpos residuais um ano após o tratamento com o hormônio em questão.

Além disso, a produção de anticorpos entre o 18º e o 25º dia após o tratamento com eCG foi mais pronunciada em animais tratados pela primeira vez que em animais que haviam sido previamente tratados.

A aplicação de eCG induz memória imunológica celular de longa duração, e essa memória imunológica parece aumentar de acordo com o número de tratamentos visto que, decorrido um ano do último tratamento com eCG, foi observada maior atividade celular proliferativa em fêmeas submetidas a três tratamentos com eCG que em fêmeas submetidas a um ou dois tratamentos.

Já em relação à resposta imunológica celular 28 dias após aplicação de eCG, o maior número de tratamentos prévios não aumenta a taxa de proliferação de linfócitos após aplicação de 2000 UI de eCG, já que nos animais previamente tratados por uma única vez a atividade celular proliferativa foi maior que nos animais que haviam sido submetidos a dois tratamentos prévios, bem como naqueles que nunca haviam sido anteriormente tratados. Além disso, tratamentos prévios não influenciam a taxa de proliferação celular após o tratamento com 400 UI de eCG, já que não foi observada diferença entre animais previamente tratados e aqueles tratados pela primeira vez.

A produção de anticorpos está positivamente correlacionada com a taxa de proliferação celular.

O número de tratamentos prévios com 400 UI de eCG não tem efeito no diâmetro do maior folículo presente no momento da retirada do dispositivo de P₄, assim como não há correlação entre a concentração de anticorpos e a o diâmetro folicular.

Da mesma maneira, o número de folículos > 6 mm em resposta ao tratamento superestimulatório com 2000 UI eCG não é influenciado pelo número de tratamentos

prévios. No entanto, existe uma correlação negativa entre a concentração de anticorpos e número de folículos > 6 mm.

7 IMPLICAÇÕES

Os dados do presente trabalho sugerem que a produção de anticorpos não diminui a eficiência do uso de eCG nos protocolos de sincronização para IATF utilizados em fazendas comerciais de gado de corte, onde a dose de eCG utilizada normalmente é de 400 UI. Isso se deve ao fato de que a produção de anticorpos se mostrou ser dose-dependente, e a baixa quantidade de anticorpos produzida frente à aplicação de 400 UI de eCG parece não apresentar influência na atividade biológica da molécula.

Já nos protocolos de SOV, nos quais se utiliza uma dose mais alta de eCG (2000 UI) em tratamentos consecutivos, a produção de anticorpos pode estar comprometendo a eficácia do tratamento superovulatório, já que, de maneira geral, a produção de anticorpos após aplicação de 2000 UI de eCG foi mais expressiva.

No entanto, a variabilidade na resposta imunológica ao eCG encontrada nesse e em outros trabalhos mostra que alguns animais produzem altas concentrações de anticorpos anti-eCG quando estimulados, enquanto outros praticamente não respondem; portanto, a eficiência do tratamento superestimulatório pode ser influenciada pela produção de anticorpos em alguns indivíduos, enquanto em outros esse fator não é significativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H. **Basic immunology**: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 322 p.

ADA, G. L.; NOSSAL, G. J. V. The clonal selection theory. **Scientific American**, v. 257, p. 50 – 57, 1987.

AHMED, R. Immunological memory against viruses. **Seminars in Immunology**, v. 4, p. 105 – 109, 1992.

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 121, p. 513-527, 2001.

ALLEN, W. R.; HAMILTON, D. W.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. **Anatomy Records**, v. 177, p. 485-502, 1973.

ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, p. 313-316, 1972.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; STEWART, F.; STEWART, J.; OUSEY, J.; FOWDEN, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy, **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 237-246, 2002.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 39, p. 7-24, 1993.

AVRAMEAS, S.; ANTOINE, J. C.; TERNYNCK, T.; PETIT, C. Development of immunoglobulin and antibody-forming cells in different stages of the immune response. **Annales d'immunologie**, v. 127, p. 551-571, 1976.

AYRES, H.; MARQUES, M. O.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Influência do uso de eCG em diferentes períodos pós parto e do escore de condição corporal na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1113, 2007.

BARIL, G.; LEBOEUF, B.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, v. 40, p. 621 – 628, 1993.

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J. F.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, v. 45, p. 1553 - 1559, 1996.

BARIL, G.; REMY, B.; VALLET, J. C.; BECKERS, J. F. Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 27, p. 161-168, 1992.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O.; RODRIGUES, C. A.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; REIS, E. L.; SÁ FILHO, M. F. Effect of treatment with eCG on conception rate in Nelore cows with different body condition scores submitted to fixed-time artificial insemination (retrospective analysis). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 228, 2004b.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P₄ e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 218, 2000.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; MELLO, J. E.; CAMPOS FILHO, E. P. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós-parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2003, **Proceedings...** Huerta Grande, 2003a, p. 380.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 244-245, 2003b.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N. S.; FERREIRA, R. M. Recent advances in bovine superovulation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 433-448, 2008.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 16., 2004, **Proceedings...** Budapest, 2004c, p.117.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 479-486, 2004a.

- 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.
- BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.
- BODIN, L.; DRION, P. V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIÉ, Y.; BECKERS, J. F. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, p. 651-660, 1997.
- BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Embryo production: alternative methods. **Molecular Reproduction Development**, v. 36, p. 266-270, 1993.
- BOURDILLON, A.; CHMITELIN, F.; JARRIN, D.; PAREZ, V.; ROUILLER, H. Effect of PMSG treatment on breeding result of artificial inseminated rabbits. **Journal of Applied Rabbit Research**, v. 15, p. 530-537, 1992.
- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHÍ, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.
- CHOPINEAU, M.; MAUREL, M. C.; COMBARNOUS, Y.; DURAND, P. Topography of equine chorionic gonadotropin epitopes relative to the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor interactions sites. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 92, p. 229-239, 1993.
- CLEGG, M. T.; BODA, J. M.; COLE, H. H. The endometrial cups and allanto chorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. **Endocrinology**, v. 54, p. 448-463, 1954.
- COLE, H. H.; HART, G. H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, v. 93, p. 57-68, 1930.
- COLLE, J. H.; LeMOAL, M. A.; TRUFFA-BACHI, P. Immunological memory. **Critical reviews in Immunology**, v. 10, p. 259-288, 1990.
- DHONDT, D.; BOUTERS, R.; SPINCEMAILLE, J.; CORYN, M.; VANDEPLASSCHE, M. The control of superovulation in the bovine with bovine a PMSG-antiserum. **Theriogenology**, v. 9, p. 529-534, 1978.
- DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in

PMSG/PG-treated cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 533-542, 1987.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; LOOS, F. A. M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? **Theriogenology**, v. 39, p. 25-41, 1993.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; WURTH, Y. A.; GIELEN, J. T.; WILLEMSE, A. H. Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. **Theriogenology**, v. 31, p. 473-487, 1989.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J. Y.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. F. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 207-215, 2001.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL JR., G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v. 9, p. 17-26, 1978.

GARSIDE, P.; INGULLI, E.; MERICA, R. R.; JOHNSON, J. G.; NOELLE, R. J.; JENKINS, M. K. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. **Science**, v. 281, p. 96-99, 1998.

GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T. D.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p.158-162, 1994.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. **Theriogenology**, v. 45, p. 765-773, 1996.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid-luteal stage of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 36, p. 949-958, 1991.

GRAKOU, A.; BROMLEY, S. K.; SUMEN, C.; DAVIS, M. M.; SHAW, A. S.; ALLEN, P. M.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T-cell activation. **Science**, v. 285, p. 221-227, 1999.

GRAY, D. Immunological memory. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 49-77, 1993.

GRAY, D., SPRENT, J. Immunological memory. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 159, p. 1-141, 1990.

IEZZI, G.; KARJALAINEN, K.; LANZAVECCHIA, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naïve and effector T cells. **Immunity**, v. 8, p. 89-95, 1998.

INABA, K.; TURLEY, S.; YAMAIDE, F.; IYODA, T.; MAHNKE, K.; INABA, M.; PACK, M.; SUBKLEWE, M.; SAUTER, B.; SHEFF, D.; ALBERT, M.; BHARDWAJ, N.; MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 2163-2173, 1998.

JAINUDEEN, M. R. Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. **American Journal Veterinary Research**, v. 27, p. 669-675, 1966.

JENKINS, M. K.; KHORUTS, A.; INGULLI, E.; MUELLER, D. L.; MCSORLEY, S. J.; REINHARDT, R. L.; ITANO, A.; PAPE, K. A. In vivo activation of antigen-specific CD4 T Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 23-45, 2001.

KEARNEY, E. R.; PAPE, K. A.; LOH, D. Y.; JENKINS, M.K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. **Immunity**, v. 1, p. 327-339, 1994.

KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. **Imunologia**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007. 704p.

LEGARDINIER, S.; CAHOEAU, C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity: lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 225-259, 2005.

MACKAY, C.R. Immunological memory. **Advances in Immunology**, v. 53, p. 217-265, 1993.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in superovulation of cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.

- MARTINS, C.M. **Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus***. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1237, 2007.
- MARTINS, C. M.; REIS, P. O.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Effect of different dosage of eCG on superovulatory response of Nelore donor (*Bos indicus*) submitted to fixed time artificial insemination. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 724, 2010.
- MARTINS, C. M.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; SOUSA, M. G.; BARUSELLI, P. S. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 227, 2006.
- MCHEYZER-WILLIAMS, M.; McHEYZER-WILLIAMS, L.; PANUS, J.; POGUE-CALEY, R.; BIKAH, G.; DRIVER, D.; EISENBRAUN, M. Helper T-cell regulated B-cell immunity. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 205-212, 2003.
- MENEGUETTI, M.; MIGUEL JR, J. C. Addition of eCG on a fixed timed artificial insemination protocol in the conception rate of cycling Nelore heifers. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, p.638, 2008.
- MENEGUETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009.
- MENZER, C.; SCHAMS, D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in vivo studies. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 339-345, 1979.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27-44, 1991.
- PENTEADO, L.; MARQUES, M. O.; SILVA, R. C. P.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo em diferentes períodos pós-parto. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 34, p. 402, 2006.
- PERELSON, A. S.; MIRMIRANI, M.; OSTER, G. F. Optimal strategies in immunology II. B Memory cell production. **Journal of Mathematical Biology**, v. 5, p. 213-256, 1977.

PERES, R. F. G.; CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-689, 2009.

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

PIPER, E.K.; JONSSON, N.N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.M.; JACKSON, L.A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 6, p. 1047-1086, 2009.

ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 997-1003, 1989.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; REIS, E. L.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Increased pregnancy rate in Nelore cows treated with eCG in different post partum periods for fixed time artificial insemination. **Acta scientiae veterinarie**, v. 32, p. 220, 2004.

ROSER, J. F.; KIEFER, B. L.; EVANS, J. W.; NEELLY, D. P.; PACHECO, C. A. The development of antibodies to human chorionic gonadotropin following its repeated injections in the cyclic mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 173-179, 1979.

ROY, F.; MAUREL, M. C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated Equine Chorionic Gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 805-813, 1999.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, p. 651-658, 2010.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210-218, 2009.

SAS Institute. 2002-2003. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 for Windows. SAS Ins., Cary, NC.

SAUMANDE, J. Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. **Journal of endocrinology**, v. 84, p. 425-437, 1980.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 679-689, 2000.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BO, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009.

SPRENT, J. T and B memory cells. **Cell**, v. 76, p. 315-322, 1994

STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. **Journal of Endocrinology**, v. 71, p. 371-382, 1976.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters . **Endocrinology**, v. 132, p. 1108-1114, 1993.

VENERANDA, G.; FILIPPI, L.; RACCA, D.; ROMERO, G.; BALLA, E.; CUTAIA, L. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and different fixed-time AI protocols. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 118, 2006.