



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ALFACORIFOLITROPINA NA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM  
FÊMEAS BOVINAS JOVENS**

**Rodrigo Martins de Moura**

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

**Rodrigo Martins de Moura**  
**ALFACORIFOLITROPINA NA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM**  
**FÊMEAS BOVINAS JOVENS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Orientador: João Henrique Moreira Viana**

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

**Rodrigo Martins de Moura**

**ALFACORIFOLITROPINA NA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM  
FÊMEAS BOVINAS JOVENS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 17/08/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Prof. Dr. Eduardo de Oliveira Melo

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Suplente:

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

Aos meus queridos pais, dedico esse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que me deu saúde e força para desenvolver esse projeto;

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Biologia e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional

Aos meus pais, por todo apoio, incentivo e suporte; sem vocês nada seria possível

Ao meu irmão, que sempre se fez disposto em me ajudar, e me orientar

À minha avó Francisca, que nunca me faltou com carinho e amor; aos meus avós *in memoriam* (Manoel Gotardo, Joaquim Ferreira e Eliete Viana) que sempre foram exemplos de pessoas a serem seguidos

À minha namorada, Arielli, que sempre esteve ao meu lado me incentivando, me acolhendo e me dando suporte em mais essa etapa

À todos funcionários da fazenda Sucupira, que sempre me ajudaram e foram peças fundamentais em todos os experimentos

Aos colegas de mestrado, por todas as vezes que me ajudaram e se fizeram presentes em todos os momentos

Ao meu orientador, Dr. João Henrique Moreira Viana, por todas orientações e oportunidades

## ÍNDICE

<b>Capítulos/subcapítulos</b>	<b>página</b>
RESUMO	xii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivo Específicos	17
1.2 HIPÓTESE	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
<b>CAPÍTULO 2: Superstimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting recombinant human FSH (corifollitropin-alpha)</b>	31
1. ABSTRACT	33
2. INTRODUCTION	35
3. MATERIAL AND METHODS	36
4. RESULTS	42
5. DISCUSSION	46
7. ACKNOWLEDGEMENTS	46
8. REFERENCES	50
9. CONSIDERATION	55
<b>ANEXOS</b>	
1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética	56
2. Resumos submetidos à congressos	57

## RESUMO

Os primeiros estudos com estimulação e produção embriões em bezerras pré-púberes foram realizados na década de 1990. Como naquela época não era possível prever o valor genético de um animal antes do início da vida produtiva, o tema recebeu pouca atenção. Com o advento dos marcadores genéticos e a evolução na eficiência da Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) esse tema voltou a ser alvo de estudos. O objetivo desse trabalho foi avaliar uma molécula de hormônio folículo estimulante recombinante humano (rhFSH) de longa ação, a alfacorifolitropina, em bezerras da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e novilhas pré-púberes utilizada em um programa de PIVE. O presente experimento foi desenvolvido em três etapas, objetivando inicialmente definir a dose resposta e posteriormente estabelecer o protocolo de pré-estimulação com rhFSH a ser utilizado para aspiração folicular (OPU) em bezerras e em novilhas pré-púberes. Foi realizado um ensaio preliminar de resposta para definir a dose a ser utilizada, definida em 10 mcg. Em seguida, bezerras foram alocadas aleatoriamente para receber rhFSH por via SC (n=5) ou IM (n=5). O desenvolvimento folicular ovariano foi monitorado diariamente por ultrassonografia por cinco dias. Em ambos os grupos o diâmetro médio do folículo aumentou ( $P < 0,0001$ ) de 0h a 96h após o tratamento, estabilizando-se a partir de então. No experimento 2, bezerras (n=90) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos: 1) GC: bezerras sem pré-estimulação; 2) rhFSH-96h: rhFSH SC e OPU 96h depois; 3) rhFSH-120h: rhFSH SC e OPU 120h depois; 4) eCG-96h: 300 UI eCG IM e OPU 96h depois; e 5) eCG-120h: 300 UI eCG IM e OPU 120h depois. Vacas nelore (n=10) foram utilizadas como referência para os resultados do PIVE. O pré-tratamento com rhFSH aumentou a proporção de complexos cumulus-oócitos (COC) grau I em comparação com eCG ou controles ( $P < 0,0001$ ), e no rhFSH-120h a taxa de blastocisto foi semelhante à de vacas maduras ( $P > 0,05$ ). No entanto, rhFSH aumentou a proporção de COC expandidos e diminuiu a proporção de COC viáveis ( $P < 0,0001$ ). No Experimento 3, novilhas pré-púberes (n=60) foram tratadas ou não (grupo controle) com rhFSH, e a OPU foi realizada 72 ou 96 horas depois. O intervalo de tratamento a aspiração não afetou nenhuma variável analisada. Novilhas pré-tratadas com rhFSH apresentaram maior proporção de COC grau I ( $P = 0,0188$ ) e taxa de blastocisto ( $P < 0,0098$ ). No entanto, este grupo apresentou menor número de COC viáveis ( $P = 0,0264$ ), resultando em quantidade semelhante ( $P = 0,5869$ ) de embriões produzidos por doadora/OPU. A taxa de prenhez também foi semelhante entre os grupos controle e rhFSH (19,3 vs. 25,0%,  $P = 0,4142$ ).

Em resumo, o tratamento com uma única injeção SC de alfacorifolitropina foi eficaz para promover a superestimulação em bezerras. No entanto, os potenciais benefícios dos protocolos pré-estimulatórios usando rhFSH foram mitigados por diminuição no número total de COC viáveis recuperados, não aumentando o número de embriões produzidos por doadora/OPU

**Palavras-chave:** Produção *in vitro* de embriões; puberdade; gonadotrofina recombinante.



## ABSTRACT

The first studies with stimulation and embryo production in prepubertal heifers were carried out in the 1990s. As at that time it was not possible to predict the genetic value of an animal before the beginning of its productive life, the topic received little attention. With the advent of genetic markers and the evolution in the efficiency of In Vitro Embryo Production (IVP) this topic was once again the target of studies. The objective of this work was to evaluate a long-acting recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH) molecule, corifollitropin alfa, in Nelore (*Bos taurus indicus*) heifers and prepubertal heifers used in an IVP program. The present experiment was carried out in three stages, initially aiming to define the dose response and later to establish the pre-stimulation protocol with rhFSH to be used for follicular aspiration (OPU) in heifers and prepubertal heifers. A preliminary response test was performed to define the dose to be used, defined as 10 mcg. Then, heifers were randomly allocated to receive rhFSH SC (n=5) or IM (n=5). Ovarian follicular development was monitored daily by ultrasound for five days. In both groups the mean diameter of the follicle increased ( $P<0.0001$ ) from 0h to 96h after treatment, stabilizing thereafter. In experiment 2, calves (n=90) were randomly assigned to 5 groups: 1) CG: calves without pre-stimulation; 2) rhFSH-96h: rhFSH SC and OPU 96h later; 3) rhFSH-120h: rhFSH SC and OPU 120h later; 4) eCG-96h: 300 IU eCG IM and OPU 96h later; and 5) eCG-120h: 300 IU eCG IM and OPU 120h later. Nelore cows (n=10) were used as a reference for the PIVE results. Pretreatment with rhFSH increased the proportion of grade I cumulus-oocyte complexes (COC) compared to eCG or controls ( $P<0.0001$ ), and in rhFSH-120h the blastocyst rate was similar to that of mature cows ( $P>0.05$ ). However, rhFSH increased the proportion of expanded COCs and decreased the proportion of viable COCs ( $P<0.0001$ ). In Experiment 3, prepubertal heifers (n=60) were treated or not (control group) with rhFSH, and OPU was performed 72 or 96 hours later. The interval from treatment to aspiration did not affect any of the variables analyzed. Heifers pre-treated with rhFSH had a higher proportion of COC grade I ( $P=0.0188$ ) and blastocyst rate ( $P<0.0098$ ). However, this group had a lower number of viable COCs ( $P=0.0264$ ), resulting in a similar amount ( $P=0.5869$ ) of embryos produced per donor/OPU. The pregnancy rate was also similar between the control and rhFSH groups (19.3 vs. 25.0%,  $P=0.4142$ ). In summary, treatment with a single SC injection of corifollitropin alfa was effective in promoting overstimulation in calves.

However, the potential benefits of pre-stimulatory protocols using rhFSH were mitigated by decreasing the total number of viable COC recovered, not increasing the number of embryos produced per donor/OPU

Keywords: In vitro embryo production; puberty; recombinant gonadotropin.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COC – Complexo Cumulus Oócito

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

hCG – Gonadotrofina Coriônica humano

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

IM - Intramuscular

LH - Hormônio Luteinizante

MIV - Maturação *in vitro*

OPU – Aspiração Folicular Orientada por Ultrassonografia

PIVE – Produção *in vitro* de Embriões

rhFSH - Hormônio Folículo Estimulante Recombinante Humano

SC - Subcutâneo

VG - Vesícula Germinativa

## LISTA DE TABELAS

Número	Título	Página
<b>Capítulo 2: Superstimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting recombinant human FSH (corifollitropin-alpha)</b>		
1	OPU-IVEP outcomes in Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ) calves submitted or not to previous stimulation protocols with rhFSH (corifollitropin-alpha) or eCG. Multiparous, non-stimulated and non-synchronized adult cows were used as controls.	43
2	OPU-IVEP outcomes in prepubertal Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ) heifers submitted or not to previous stimulation protocols with rhFSH (corifollitropin-alpha).	44

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
<b>Capítulo 2: Superstimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting recombinant human FSH (corifollitropin-alpha)</b>		
1	Changes in follicle diameter over time in a dose-response superstimulation trial with rhFSH (corifollitropin-alpha) in Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ) calves. After 120 h, follicle diameter in calves treated with $\geq 10$ mcg rhFSH was greater ( $P < 0.05$ ) than in the control group.	40
2	Effect of the route of administration (SC or IM) of rhFSH on ovarian stimulatory response in Nelore ( <i>Bos taurus indicus</i> ) calves. A) Average follicle diameter over time; B) Intrafollicular estradiol (E2) concentrations 120 h after treatment.	41

## LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética	56
2	Resumos submetidos à congressos	57

1  
2  
3  
4  
5

## **CAPÍTULO 1**

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

## 6 INTRODUÇÃO GERAL

7

8 A taxa de progresso genético é parcialmente determinada pela intensidade de  
9 seleção (quanto maior, melhor) e o intervalo de gerações (quanto menor, melhor).  
10 Para acelerar a taxa de avanço genético há o interesse em reproduzir os melhores  
11 animais em idade mais jovem. Em bovinos, as primeiras tentativas de produzir  
12 embriões *in vivo* a partir de bezerras superovuladas tiveram resultados frustrantes. No  
13 início da década de 90, com o advento da Fecundação *in vitro* (FIV) e a laparoscopia  
14 como método de coleta de oócitos de pequenos ruminantes foram realizadas  
15 tentativas de produzir embriões *in vitro* a partir de oócitos recuperado de bezerras,  
16 porém com resultados considerados ruins.

17 Naquela época, era extremamente difícil de prever o valor genético de um  
18 animal pré-púbere. Associado ao baixo sucesso da técnica, isso explica porque a  
19 tecnologia recebeu pouca atenção após alguns anos. Duas décadas depois, as  
20 bezerras voltam a ser alvo de estudo devido ao desenvolvimento de marcadores  
21 genéticos que permitem prever o fenótipo de produção dos animais, sem necessidade  
22 de esperar até que o animal tenha idade produtiva para expressar seu potencial. Com  
23 isso, aumentou o interesse na cadeia produtiva em desenvolver ferramentas de  
24 reprodução assistida que permitam a propagação de animais geneticamente  
25 superiores em idade pré-púbere.

26 Tecnologias de produção *in vitro* de embriões (PIVE) evoluíram  
27 significativamente nos últimos 20 anos, melhorando a taxa de embriões transferíveis.  
28 Estudos anteriores com animais adultos demonstraram que estimulação com Hormônio  
29 Folículo Estimulante (FSH) resulta em maior competência de desenvolvimento dos  
30 oócitos, o que foi associado a uma maior proporção de folículos maiores que 5mm.  
31 No entanto, os resultados com animais pré-púberes ainda são controversos, e os  
32 protocolos convencionais difíceis de serem incluídos em uma rotina comercial. Nesse  
33 sentido, o surgimento de novas moléculas de FSH, baseadas na tecnologia do DNA  
34 recombinante, abre a oportunidade para o desenvolvimento de protocolos alternativos  
35 para a preparação de doadoras de oócitos pré-púberes .

36

37

38

39



## 40 **OBJETIVOS**

41

### 42 **Objetivo Geral**

43 O objetivo geral desta dissertação foi, no primeiro momento definir a dose a ser  
44 utilizada de alfacorifolitropina, testar vias de aplicação desta molécula e o  
45 desenvolvimento de um protocolo alternativo de priming com alfacorifolitropina alfa  
46 para melhoria na produção de embriões em animais pré-púberes

47

48

49

50

### 51 **Objetivos Específicos**

52 - Estabelecer uma dose a ser utilizada

53 - Caracterizar a resposta ovariana à alfacorifolitropina em bezerras;

54 - Estabelecer um protocolo de superestimulação ovariana utilizando a  
55 alfacorifolitropina ;

56 - Avaliar o número e qualidade dos complexos cumulus-oócito recuperados após o  
57 uso do protocolo na preparação de bezerras e novilhas pré-púberes;

58 - Avaliar a produção *in vitro* de embriões subsequente ao uso da pré-estimulação com  
59 alfacorifolitropina em bezerras e novilhas pré-púberes.

60

## 61 **HIPÓTESE**

62 A alfacorifolitropina é capaz de promover uma superestimulação ovariana em  
63 dose única, e resultar em aumento na taxa de produção de embriões em bezerras e  
64 novilhas pré-púberes e, portanto, pode ser utilizada como alternativa dos protocolos  
65 já existentes.

66

67

## 68 REVISÃO DE LITERATURA

69

70 Puberdade em bovinos

71

72 O início da puberdade coincide com a primeira oportunidade de uma novilha  
73 conceber e deve ser definido como o primeiro estro ovulatório seguido por uma fase  
74 lútea de duração normal (Perry, 2016). Embora o estro púbere seja a primeira  
75 oportunidade para uma novilha se tornar gestante, a fertilidade não é ótima neste  
76 momento (Byerley, 1987). A puberdade é atingida no momento em que o animal se  
77 torna capaz de liberar gametas e demonstrar comportamento sexual completo. Na  
78 puberdade, as gônadas assumem a esteroidogênese e gametogênese. Em condições  
79 normais de criação, a puberdade ocorre ao redor de 12 meses em bovinos (Hafez,  
80 1982). A puberdade é um processo, variável, que depende de vários fatores, como  
81 ambientais, genéticos e nutricionais, que se interagem e influenciam todo o eixo  
82 nervoso e endócrino, podendo alterar a idade à puberdade do animal (Amann e  
83 Schambacher 1983).

84 Ainda quando feto, os ovários das fêmeas bovinas já apresentam folículos. No  
85 nascimento a bezerra possui um número de ovócitos pré-determinado, e por isso a  
86 importância e preocupação em melhor aproveitá-los, visto que os oócitos não tem  
87 estoque renovável e menos de 0,1% dos folículos chegam a ovular (Gosden, 1998) .A  
88 idade à puberdade define uma expectativa de vida produtiva do animal, e essa  
89 depende de fatores genéticos e nutricionais. De acordo com Patterson et al., 1992 as  
90 novilhas precisam parir aos 24 meses de idade para alcançar a produtividade máxima  
91 ao longo da vida. Freetly 2011 relatou que, em várias raças, as novilhas tinham 55 a  
92 60% do peso corporal de um animal adulto quando a puberdade foi alcançada

93 A puberdade é uma série complexa de eventos que requer a maturação do eixo  
94 hipotálamo-hipófise-ovariano. É necessário um feedback estimulador para a indução  
95 de um pico de Hormônio Luteinizante (LH), e conseqüente ovulação, e embora a  
96 ovulação possa ocorrer induzindo um pico de LH durante o estágio pré-púbere, o  
97 retorno dos animais ao anestro e a atividade normal de ciclo é não sustentado  
98 (McLeod et al., 1995).

99 Há um aumento no diâmetro uterino das bezerras em crescimento até três  
100 meses de idade, de 9 a 14mm (Jacqueline A et al., 2013). Com 6 meses esse diâmetro

101 se estabiliza com 16mm (Honaramooz et al., 2004. Entre 8 a 15 meses de idade o  
102 diâmetro uterino retorna ao crescimento. O crescimento e desenvolvimento uterino é  
103 influenciado pelo estrógeno presente no folículo dominante. O comprimento e o peso  
104 do útero aumentam desde o nascimento (7,7 cm e 6 g, respectivamente até os 12  
105 meses de idade (24,3 cm e 150 g, respectivamente) (Desjardins, 1969)

106 Desjardins, 1969 e Hafs, 2004 relataram um período de rápido aumento do  
107 peso ovariano durante os primeiros 5 meses em novilhas seguido de um platô até os  
108 8 meses e uma retomada do crescimento até os 12 meses de idade. Durante os três  
109 primeiros meses de vida, há um aumento no número de folículos dominantes  
110 presentes nos ovários (Desjardins, 1969). Na subespécie *Bos taurus*, existe  
111 correlação positiva entre o número total de folículos e a contagem de folículos antrais.  
112 ( Erickson 1996). Além disso, a contagem de folículos antrais ( $\geq 3$  mm) é repetível  
113 dentro de um animal, mas varia entre os animais. (Evans, 2010). Ainda não há  
114 evidências de quais fatores afetam a contagem dos folículos antrais. Trabalhos  
115 relatam efeito da programação fetal, exercendo efeito na contagem desses folículos  
116 (Weller et al., 2016). Esses efeitos podem perdurar por toda a vida pós fetal deste  
117 animal, influenciando na eficiência reprodutiva. Deficiência nutricional no início da  
118 gestação afeta o desenvolvimento da placenta, alterando sua vascularização, e a  
119 quantidade de células reprodutivas do feto (Tsuneda et al., 2017).

120 Taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro* aumentaram quando os  
121 oócitos foram recuperados de bezerros de grupos com folículos maiores. A contagem  
122 de folículos antrais foi positivamente correlacionada à fertilidade em bovinos  
123 (Cushman 2009)

124

125 Produção de embriões em animais pré-púberes

126

127 A produção *in vitro* de embriões em animais pré-púberes seguido pela  
128 transferência de embriões em receptoras representa um grande potencial para ganho  
129 genético, visto que o intervalo entre gerações é encurtado. Em um programa de  
130 melhoramento genético, quanto menor o intervalo de gerações, mais rápido se evolui  
131 (Baldassare et al., 2018). A produção *in vitro* de embriões em animais pré-púberes  
132 acelera esse melhoramento, visto que, há possibilidade de produzir embriões de  
133 animais pré-púberes. Bezerras pré-púberes podem contribuir em aumentar o ganho  
134 genético, pois além de diminuir o intervalo de gerações há um ganho no

135 aproveitamento dos oócitos disponíveis nos ovários logo após o nascimento, que  
136 entrariam em atresia caso não fossem aproveitados. Desse modo um animal de alto  
137 valor genético produz mais filhos na vida reprodutiva. Animais pré-púberes  
138 representam uma fonte rica e inexplorada de germoplasma (Lohuis, 1995). Com o  
139 desenvolvimento comercial da PIVE, disponibilidade de profissionais, equipamentos e  
140 laboratórios, o sucesso dessa produção depende de fatores individuais da doadora de  
141 oócitos. Fatores animais como subespécie, raça, idade, estado fisiológico e  
142 populações de folículos, juntamente com fatores externos, incluindo nutrição,  
143 estresse, tratamento hormonal e frequência de aspiração folicular podem influenciar o  
144 crescimento do folículo e a qualidade do Complexo Cumulus Oócito (COC) (Baruselli,  
145 2016). Em vista disso, bezerras pré-púberes podem ser utilizadas em programas de  
146 melhoramento animal, contribuindo para aumentar o ganho genético e diminuir o  
147 intervalo entre gerações, proporcionando assim maior aproveitamento dos oócitos  
148 disponíveis, explorando o potencial de animais de alto valor zootécnico.

149 O desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de  
150 doadoras pré-púberes tem sido variável. Armstrong et al., 1998 Não observou  
151 diferença significativa nas taxas de fecundação e desenvolvimento de oócitos de vaca  
152 e bezerras maturados em *in vivo* ou *in vitro*. Relatou também uma taxa de gestação  
153 de 43% e 33% de nascimentos de embriões produzidos *in vitro* por oócitos de  
154 bezerras. Revel et al., 1995. Relatou taxa de gestação de embriões PIVE de bezerras  
155 pré-púberes que foram semelhantes aos de vacas adultas; no entanto encontrou uma  
156 maior perda fetal tardia

157 O número de folículos antrais variam amplamente dentro da mesma raça, mas  
158 tem alta repetibilidade no mesmo indivíduo. Essa população folicular é estabelecida  
159 durante a gestação da fêmea, e ao nascimento, esse número de oócitos já está pré-  
160 determinado. (Burns , 2005) Em bovinos adultos, a estimulação com FSH, recrutará  
161 folículos com diâmetro de 2mm, e estimulará o seu crescimento, mas não aumenta o  
162 número total de folículos disponíveis para aspiração folicular (Driancourt, 2001). Em  
163 contraste, a administração de FSH a bezerras de 5 meses de idade parece recrutar  
164 folículos do pool menores que 2 mm de diâmetro e aumentar significativamente o  
165 número disponível para aspiração folicular, pelo menos em seus programas de  
166 estimulação inicial (Findlay, 1996; Fry, 1997; Taneja , 2000). Isso pode explicar em  
167 parte, a menor competência do desenvolvimento COC coletados de animais jovens  
168 (Landry, 2016; Sirard 2006)

169 Alguns trabalhos obtiveram embriões viáveis, gestações e bezerras nascidos,  
170 provenientes de oócitos de bezerras pré-púberes em diferentes idades (Kajihara et al.,  
171 1991; Armstrong et al., 1992; Revel et al., 1995; Fry et al., 1998; Bols et al., 1999;  
172 Brogliatti et al., 1999; Malard, 2000; Taneja et al., 2000). Entretanto, os oócitos  
173 coletados de bezerras são menos competentes para se desenvolver em embriões que  
174 os de vacas (Seidel et al., 1971; Palma et al., 1993; Lévesque & Sirard, 1994; Revel  
175 et al., 1995; Damiani et al., 1995, 1996; Khatir et al., 1996; Kuwer et al., 1999); Oócitos  
176 de bezerras são menores, possuem zonas pelúcidas mais finas, a migração e  
177 redistribuição dos grânulos corticais são tardias, têm configurações anormais de  
178 cromatina e microtúbulos e oscilações irregulares de cálcio, em comparação com  
179 vacas (Damiani et al., 1995). Além disso, tem perfis proteicos e metabólicos diferentes  
180 em comparação com ovócitos de vaca. (Armstrong 2001) esta competência parece  
181 aumentar com a idade da bezerra (Presicce et al., 1997). Damiani et al., 1995  
182 atribuíram, em parte, a baixa competência de desenvolvimento dos oócitos de  
183 bezerras à maturação citoplasmática incompleta ou tardia. O oócito adquire  
184 competência de desenvolvimento imediatamente antes da ovulação (Luciano, 2018).  
185 Um indicador de competência oocitária é a remodelação da cromatina em grande  
186 escala. Em vacas foram descritos quatro configurações de cromatina correspondentes  
187 a diferentes estágio de competência de desenvolvimento, GV0 a GV3. EM GV0 a  
188 cromatina aparece não condensada e dispersa. Ao decorrer da condensação marca  
189 a transição para os estágios subsequentes. O maior nível de condensação ocorre no  
190 estágio de GV3 (Gilchrist, 2016). Folículos antrais médios (2-8mm) tem a maioria dos  
191 oócitos em estágios avançados GV1, GV2 e GV3. Estes folículos são os mais  
192 utilizados para a produção *in vitro* após a maturação *in vitro* (MIV). Khatir et al., 1997.  
193 demonstraram a incapacidade dos oócitos de bezerras em responder à  
194 suplementação de soro ou fluido folicular durante a maturação *in vitro* para uma  
195 melhora subsequente no desenvolvimento durante a cultura. Eles especularam que a  
196 falta de receptores para gonadotrofinas ou fatores de crescimento era o motivo da  
197 falta de resposta. Diferenças significativas entre oócitos de vaca e bezerro em termos  
198 de seus respectivos tamanhos, bem como diferenças em seu metabolismo energético  
199 durante a MIV, também foram relatadas por Gandolfi et al 1998

200 Estudos de estimulação ovariana com gonadotrofinas com objetivo de  
201 aumentar o número de oócitos para Aspiração Folicular Orientada por  
202 Ultrassonografia (OPU) tem sido realizados em diferentes protocolos e obtendo

203 resultados variáveis (Kajihara et al., 1991; Stubbings et al., 1992, 1993; Armstrong et  
204 al., 1992, 1994; Revel et al., 1995; Looney et al., 1995; Damiani et al., 1996; Tervit et  
205 al., 1997; Presicce et al., 1997; Fry et al., 1998; Malard, 2000; Taneja et al., 2000). O  
206 priming realizado antes da OPU melhorou a produção de embriões, comparado a  
207 bezerras da mesma idade e sem estimulação (Presicce et al., 1997). Estudos já  
208 realizados mostram que bezerras necessitam de um priming de gonadotrofinas antes  
209 da OPU, para melhoria do número e qualidade de ovócitos aspirados e,  
210 conseqüentemente maior taxa de produção de blastocistos (Revel, 1995). A  
211 subespécie (*Bos taurus indicus*), representante da maior parte dos bovinos no Brasil,  
212 tem como característica o alcance da puberdade entre 19,9 a 28,7 meses (Silva &  
213 Romano, 1991; Restle et al., 1999; Rodrigues et al., 1999), por isso são de extrema  
214 importância estudos nessa subespécie, visto que a grande parte dos trabalhos foram  
215 realizados em animais *Bos taurus taurus*.

216

217 Estimulação exógena do desenvolvimento folicular em bovinos

218

219 A tecnologia reprodutiva revolucionou a produção na indústria de carne e leite  
220 durante o século passado. Primeiramente com a inseminação artificial,  
221 criopreservação de sêmen, protocolos de superovulação e o cultivo *in vitro* de  
222 embriões (Moore et al., 2017). As primeiras estimulações exógenas datam de 1943  
223 por Cásida et al., Mais tarde, em 1951, Tim Rowson desenvolveu métodos para  
224 induzir a estimulação folicular e a produção de oócitos usando gonadotrofina coriônica  
225 equina. O resultado foi bastante variável, com oócitos não ovulados e recuperação de  
226 embriões de baixa qualidade (Moore et al., 2017)

227

228 Logo após o nascimento, os ovários de uma fêmea bovina são povoados por  
229 milhares de folículos, entretanto, pequena parte desenvolvem, maturam e chegam até  
230 o estágio de dominância para atingir a ovulação durante a vida reprodutiva (Evans,  
231 2012). Quando em puberdade, a cada ciclo estral, apenas um folículo do pool de  
232 oócitos consegue chegar ao estágio de dominância e alcançar a ovulação. Do grupo  
233 de folículos que iniciam a onda, um deles é selecionado e continua se desenvolvendo,  
234 enquanto que o restante dos folículos entra em atresia. Esses folículos que entrariam  
235 em atresia podem ser aproveitados pela estimulação exógena com hormônios como  
236 FSH ou a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) (Chupin et al, 1984). A estimulação

237 exógena pode ser definida então, como sendo o resultado do tratamento hormonal de  
238 folículos terciários até o estágio de pré-ovulação seguida de múltiplas ovulações.

239 A maioria das vacas hoje em dia são superestimuladas com extratos  
240 hipofisários contendo FSH. Foi relatado que extratos hipofisários purificados com  
241 baixa contaminação por LH melhoram a resposta superovulatória em bovinos (Chupin  
242 et al, 1984). A meia vida do FSH em bovinos foi estimada por 5 horas ou menos  
243 (Laster, 1972), com isso, torna-se necessário a aplicação duas vezes ao dia. O  
244 protocolo mais utilizado tem sido o tratamento por via intramuscular duas vezes ao  
245 dia, por quatro ou cinco dias, com produtos como o extrato hipofisário parcialmente  
246 purificado ( Folltropin-V; Vetoquinol). 48 a 72 horas após o início do tratamento é  
247 administrado uma dose de prostaglandina 2 $\alpha$ , induzindo a luteólise. O estro ocorre em  
248 36 a 48 horas, com ovulações começando 24 a 36 horas depois (Mapletoft, 2012)

249 A competência de desenvolvimento dos oócitos depende do tamanho e dos  
250 estágios dos folículos, e o priming do FSH antes da OPU pode promover o  
251 crescimento folicular e melhorar a competência de desenvolvimento dos oócitos.  
252 Quando as doadoras são superestimuladas, observa-se um aumento significativo na  
253 taxa de blastocisto, mas pode variar de 50 a 80% (Luciano, 2018). A competência de  
254 desenvolvimento é definida como a capacidade de um oócito de adquirir maturação  
255 nuclear, citoplasmática e molecular e, portanto, a capacidade para produzir um  
256 blastocisto após a fecundação que resultará em uma prole saudável após a  
257 transferência do embrião (Luciano, 2018). Embora a maioria dos oócitos em folículos  
258 antrais imaturos ( $\geq 2$  mm, diâmetro do oócito: aproximadamente 110  $\mu\text{m}$ ) adquira  
259 competência para a maturação nuclear (Fair, 1995) , a maioria dos oócitos não terá  
260 adquirido competência citoplasmática e/ou molecular quando comparados com  
261 oócitos maiores (120  $\mu\text{m}$  ) de folículos suficientemente crescidos in vivo (Hagemann  
262 1999, Otoi 1997). Para aumentar o crescimento folicular e a competência de  
263 desenvolvimento dos oócitos, a administração de FSH antes da OPU (FSH-priming)  
264 foi realizada em muitos estudos (Sugimura, 2017 e Sirard 2016). Estudos anteriores  
265 sugeriram que a competência de desenvolvimento dos oócitos pode ser melhorada  
266 pela adição de uma etapa de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV), antes da MIV. A pré-  
267 MIV inibe a quebra da vesícula germinativa (VG) e mantém os oócitos no estágio de  
268 VG para adquirir a competência de desenvolvimento completa dos oócitos *in vitro*  
269 durante a meiose (Gilchrist, 2016). Em casos de superestimulação ovariana, um

270 suporte de gonadotrofina por alguns dias geralmente permite a recuperação de  
271 oócitos totalmente competentes (Kovacs, 2006).

272

273

274 Desenvolvimento e uso da alfacorifolitropina na medicina humana

275

276 Como parte do tratamento de FIV/ injeção intracitoplasmática de  
277 espermatozoide (ICSI), a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas é o  
278 primeiro passo, esse processo é considerado um fator chave para o sucesso da FIV  
279 e ICSI. O hormônio glicoproteico folículo estimulante é usado clinicamente em homens  
280 para induzir a espermatogênese e em mulheres para induzir o crescimento do folículo  
281 ovariano e promover a maturação para um folículo pré-ovulatório contendo um oócito  
282 competente para a fecundação (Casarini, 2016). Atualmente um dos grandes  
283 problemas do tratamento para estimulação ovariana em pacientes com ICSI são as  
284 injeções diárias de gonadotrofinas. Com o advento da biologia molecular de produção  
285 de DNA recombinante permitiu a síntese de proteínas terapêuticas *in vitro* e foi  
286 possível produzir um FSH de longa ação, chamado de alfacorifolitropina. A tecnologia  
287 recombinante melhorou ainda mais o processo de purificação, diminuindo a  
288 complexidade do material de partida. A folitropina foi produzida por muito anos através  
289 de métodos de DNA recombinante e foi usada clinicamente, independente do estado  
290 de glicosilação. Uma primeira geração foi referida como folitropina alfa. Outra  
291 folitropina também preparada por métodos de DNA recombinante foi genericamente  
292 rotulada folitropina beta (de Leeuw R, 1996) . A folitropina alfa foi a mais parecida com  
293 o FSH endógeno e foi relacionada a uma maior taxa de gravidez em mulheres  
294 (Orvieto, 2009). Orvieto estudou ciclos de fecundação *in vitro* em pacientes com  
295 prognóstico favorável, 75% pacientes com folitropina alfa e 25% pacientes com  
296 folitropina beta. Os dois grupos alcançaram número comparável de oócitos  
297 recuperados, mas o uso da beta folitropina foi associado a uma tendência a uma  
298 menor taxa de gravidez e a níveis de estrógeno significativamente mais altos, apesar  
299 do uso de uma dose total de gonadotrofina significativamente menor

300 Com esta molécula, apenas uma injeção é capaz de substituir injeções diárias  
301 de FSH, o que torna o tratamento mais simplificado, já que a paciente não precisa  
302 levar as injeções para aplicação em casa.



303 A alfacorifolitropina é uma nova molécula híbrida com atividade estimuladora  
304 de folículos. Tem uma meia vida mais longa, com uma meia vida plasmática de  
305 aproximadamente 65 horas (Duijkers et. Al, 2002). A alfacorifolitropina compreende  
306 uma subunidade alfa, que é idêntica à do FSH, e uma subunidade beta, que é  
307 produzida pela fusão do peptídeo C-terminal da subunidade beta da Gonadotrofina  
308 Coriônica Humana (hCG) com a subunidade beta do FSH (Schanke 2010)

309 A dose ideal de alfacorifolitropina foi calculada em 100 µg para mulheres com  
310 peso corporal ≤ 60 kg e 150 µg para mulheres com peso corporal > 60 kg,  
311 respectivamente. As taxas de gravidez múltipla ou síndrome de hiperestimulação  
312 ovariana com alfacorifolitropina não aumentaram em relação ao regime diário de FSH.  
313 A molécula de alfacorifolitropina não parece ser imunogênica e não induz a formação  
314 de anticorpos neutralizantes. A hipersensibilidade ao medicamento e as reações no  
315 local da injeção não são aumentadas. A incidência e a natureza dos eventos adversos  
316 e eventos adversos graves são semelhantes às injeções diárias de FSH, tornando  
317 assim a alfacorifolitropina uma alternativa para tratamento de estimulação ovariana  
318 em mulheres.

319

320

321

322

323

324

## 325 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

326

327 GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-  
328 stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J Reprod  
329 Fertil 1992;94(1):177-88

330

331 Armstrong, DT, Kotaras, PJ, Earl CR. Advances in production of embryos in vitro from  
332 juvenile and pre-pubertal oocytes from the calf and lamb. Reproduction, Fertility  
333 and Development, v.9, 333-339, 1997

334

335 Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark R.F. Gonadotropin stimulation  
336 regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes.  
337 Theriogenology, 42 (1994), 1227-1236  
338

339 Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D. et al.  
340 Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by  
341 laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology, 38 (1992), 667-678  
342

343 Atkins JA, Pohler KG, Smith MF. Physiology and Endocrinology of Puberty in Heifers,  
344 Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Volume 29, Issue 3,  
345 2013, 479-492  
346

347 Baldassarre H. Ovum pick-up followed by in vitro production of embryos in sheep and  
348 cattle K. Ostensson, W.G. Vale (Eds.), 4th SIPAR on animal biotechnology for Latin  
349 America (1998), 62-70 Belem, Pará, Brazil  
350

351 Baldassarre H, Bordignon V. Laparoscopic ovum pick-up for in vitro embryo production  
352 from dairy bovine and buffalo calves. Brazilian Embryo Technology Society (SBTE),  
353 2018.  
354

355 Blondin, P. Logistics of large-scale commercial IVF embryo production. Reproduction,  
356 Fertility and Development, v. 29, n. 1, 32–36, 2017.  
357

358 Baruselli PS, Batista EOS, Viera LM, Ferreira RM, Guerreiro BG, Bayeux BM, Sales  
359 JMS, Souza AH, Gimenes LU. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro  
360 production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive  
361 stages Anim Reprod, 13 (2016), 267-272  
362

363 Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral  
364 follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals,  
365 very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-  
366 stimulating hormone concentrations. Biol Reprod. 2005 Jul;73(1):54-62.  
367

368 Casarini L, Brigante G, Simoni M, Santi D. Aplicações Clínicas de Gonadotropinas na  
369 Mulher: Reprodução Assistida e Além. Prog Mol Biol Transl Sci (2016) 143:85-119.

370 Chupin D, Combarrous Y, Procureur R. Antagonistic effect of LH in commercially  
371 available gonadotrophins. *Theriogenology*, 25 (1984), 167  
372

373 Callesen H, Greve T, Christensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine  
374 follicular oocytes. *Theriogenology*, v.27, 217, 1987  
375

376 Duijkers IJM, Klipping C, Boerrigter PJ, Machielsen CSM, de Bie JJ, Voortman G.  
377 Single-dose pharmacokinetics and effects on follicular growth and serum hormones  
378 of a long-acting recombinant FSH preparation (FSH-CTP) in healthy women with  
379 pituitary. *Hum Reprod*. 2002; 17 : 1987-1993  
380

381 Evans AC, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW,  
382 Ireland JJ . Effects of maternal environment during gestation on ovarian  
383 folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest*  
384 *Anim*. 2012 Aug;47 Suppl  
385

386 Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational  
387 competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42 (1995), 437-442  
388

389 Goddard ME , Hayes BJ. Seleção genômica *J Anim Breed Genet* , 124 ( 2007, 323 –  
390 330  
391

392 Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, et al. Oocyte  
393 maturation and quality: role of cyclic nucleotides *Reproduction*, 152 (2016),. R143-  
394 R157  
395

396 Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, et al.  
397 Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles:  
398 interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia *Mol Reprod Dev*,  
399 53 (1999), 451-458  
400

401 James AD, Aguirre AU; New Human Follitropin Preparations: How Glycan Structural  
402 Differences May Affect Biochemical and Biological Function and Clinical Effect.  
403 *Frontiers in Endocrinology*, 19 march 2021.

404

405 Kovacs P, Matias S, Repolho SG. Effect of coasting on cycle outcome during in vitro  
406 fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles in hyper-responders. *Fétil*  
407 *estéril* 2006;85:913–917

408

409 Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P. Characterization of calf follicular fluid  
410 and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *J Reprod*  
411 *Fertil.* 1997 Nov;111(2):267-75.

412

413 Leeuw R, Mulders J, Voortman G, Rombout F, Damm J, Kloosterboer L. Structure-  
414 function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol*  
415 *Hum Reprod* (1996) 2(5):361–9.

416

417 Lohuis, M. M. "Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to  
418 genetic improvement programs." *Theriogenology* 43.1 (1995): 51-60.

419

420 Luciano AM, Sirard AM. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular  
421 differentiation. *Biology of reproduction*, 2018

422

423 Malard PF, Peixer MAS, Grazia JG, Brunel HDSS, Feres LF, Villarroel CL, Siqueira  
424 LGB, Dode MAN, Pogue R, Viana JHM, Carvalho JL. Intraovarian injection of  
425 mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a  
426 bovine model of fertility loss.. *Sci Rep.* 2020 May 15;10(1):8018.

427

428 Mapletoft R, Bó G. The evolution of improved and simplified superovulation protocols  
429 in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24 (2012), 278-283

430

431 Murphy B, Mapletoft R, Manns J, Humphrey W. Variability in gonadotrophin  
432 preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21  
433 (1984), 117-125

434

435 McLeod, BJ, Peters AR, Haresign W, Lamming GE. Plasma LH and FSH responses  
436 and ovarian activity in prepubertal heifers treated with repeated injections of low  
437 doses of GnRH for 72 h *J Reprod Fertil* , 74 ( 1985 ) , 589 – 596

438

439 Patterson DJ, Smith MF. Management considerations in beef heifer development and  
440 puberty. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2013 Nov;29(3):xiii-xiv.

441

442 Presicce, G. A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C. R., Godke, R. A., & Yang,  
443 X. (1997). Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for  
444 embryogenesis in prepubertal calves. *Biology of reproduction*, 56(2), 386-392.

445

446 Oliveira MVS. et al. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação  
447 ovocitária em bezerras pré-púberes da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Revista*  
448 *Brasileira de Zootecnia*: v.32, n.1, 106-114, 2003.

449

450 Orvieto R, Nahum R, Rabinson J, Ashkenazi J, Anteby EY, Meltcer S. Follitropin-alpha  
451 (Gonal-F) versus follitropin-beta (Puregon) in controlled ovarian hyperstimulation  
452 for in vitro fertilization: is there any difference? *Fertil Steril* (2009) 91(4 Suppl):1522–  
453 5.

454

455 Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in  
456 relation to developmental competence. *Theriogenology*, 48 (1997), . 769-774

457

458 Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmilller RB, Corah LR.  
459 Management considerations in heifer development and puberty *J Anim Sci* 70  
460 (1992) , . 4018-4035

461

462 Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental capacity  
463 of fertilized and in vitro matured oocytes of calves compared to cows. *J Reprod*  
464 *Fertil* , 103 ( 1995 ) , . 115 – 120

465

466 Sirard MA. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: the  
467 effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle.  
468 *Theriogenology*, 86 (2016), . 54-61

469

470 Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. Relationship between follicle  
471 size and ultrasound-guided transvaginal recovery Anim Reprod Sci, 67 (2001), .  
472 37-43  
473

474 Stubbings RB, Wosik C, Armstrong DT. Ovarian response in calves to multiple versus  
475 a single subcutaneous injection of Folltropin. Theriogenology, 39 (1993), . 321  
476

477 Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, et al.  
478 Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding na  
479 oocyte with high developmental competence. Sci Rep, 7 (2017), . 6815  
480

481 Tervit R, McMillan W, McGowan L, Smith J, Voges H, Lynch P, Larsen J, Hall D. Follicle  
482 development, superovulation and in vitro embryo production from calves. Proc Aust  
483 Soc Reprod Biol Reprod, 27 (1995), 1  
484

485 Tervit HR. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. Anim  
486 Reprod Sci, 42 (1996), . 227-238  
487

488 Taneja M , Bols PEJ , Velde AV , Ju JC , Schreiber D , Tripp MW , Levine H , Echelard  
489 Y , Riesen J , Yang X. In Vitro and in Vivo oocyte developmental competence of  
490 juvenile calves: Influence of donor animal variation and repeated gonadotropin  
491 biology of reproduction , 206–213, 2000  
492

493 Viana JHM. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm  
494 animals: Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in  
495 vitro. Embryo Technology Newsletter, v. 36, n.4, 2020  
496

497 Weller, M. M. D. C. A., Fortes, M. R. S., Marcondes, M. I., Rotta, P. P., Gionbeli, T. R.  
498 S., Valadares Filho, S. C., & Guimarães, S. E. F. (2016). Effect of maternal nutrition  
499 and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle.  
500 Journal of Dairy Science, 99(4), 3056-3071.  
501  
502  
503  
504

505

506

## **CAPÍTULO 2**

507

**Artigo em redação para submissão ao periódico Theriogenology**

508

509

510

**Superstimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting**

511

**recombinant human FSH (corifollitropin-alpha)**

512

513

514

515 Superstimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting  
516 recombinant human FSH (corifollitropin-alpha)

517

518 Rodrigo Martins de Moura<sup>a</sup>, Carlos Antonio Carvalho Fernandes<sup>b</sup>, Luiz Gustavo  
519 Bruno Siqueira<sup>c</sup>, Ricardo Alamino Figueiredo<sup>d</sup>, Carlos Frederico Martins<sup>e</sup>, Maurício  
520 Antonio Silva Peixer<sup>f</sup>, Marcelo Cunha Xavier<sup>f</sup>, Joao Henrique Moreira Viana<sup>a,d\*</sup>

521

522 <sup>a</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900 Brazil

523 <sup>b</sup> Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, MG, 37130-000 Brazil

524 <sup>c</sup> Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 36038-330 Brazil

525 <sup>d</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70770-901 Brazil

526 <sup>e</sup> Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil

527 <sup>f</sup> Bio Biotecnologia Animal, Brasília, DF, Brazil

528

529

530 Corresponding Author: Joao Henrique Moreira Viana

531 Address: PqEB, Av. W5 Norte, Brasília, DF, 70770-917 Brazil

532 Phone: +55-61-3448-4693

533 Email: henrique.viana@embrapa.br

534

535 **Running title:** Superstimulation with rhFSH in calves

536

537



538 **Abstract**

539           The aim of this study were to evaluate the use of a long-acting recombinant  
540 human FSH (rhFSH, corifollitropin-alpha) to induce superstimulation in Nelore breed  
541 (*Bos taurus indicus*) calves and pre pubertal heifers used for ovum pick-up (OPU) and  
542 in vitro embryo production (IVEP). A preliminary dose-response trial was performed to  
543 define the dose (10 mcg) of rhFSH used in subsequent experiments. In Experiment 1,  
544 calves were randomly allocated to receive rhFSH either SC (n=5) or IM (n=5). Ovarian  
545 follicular development was monitored daily by ultrasonography for five days. We did  
546 not observe an effect of route (P=0.1348) nor an interaction route x time (P=0.8336).  
547 In both groups the average follicle diameter increased (P<0.0001) from 0h to 96h after  
548 treatment (growth rate 1.0±0.1 mm/day), stabilizing thereafter. In Experiment 2, calves  
549 (n=90) were randomly allocated into 5 groups: 1) CG: calves with no pre-stimulation;  
550 2) rhFSH-96h: rhFSH SC and OPU 96h later; 3) rhFSH-120h: rhFSH SC and OPU  
551 120h later; 4) eCG-96h: 300 IU eCG IM and OPU 96h later; and 5) eCG-120h: 300 IU  
552 eCG IM and OPU 120h later. Nelore mature cows (n=10) were used as a reference for  
553 IVEP outcomes. The pre-treatment with rhFSH increased the proportion of grade I  
554 cumulus-oocyte complexes (COC) compared with eCG or controls (P<0.0001), and in  
555 the rhFSH-120h blastocyst rate was similar to the one from mature cows (P>0.05).  
556 However, rhFSH increased the proportion of expanded COC and decreased the  
557 proportion of viable COC (P<0.0001). In Experiment 3, prepubertal heifers (n=60) were  
558 treated or not (control group) with rhFSH, and OPU was performed 72 or 96 h later.  
559 The interval from treatment to follicle aspiration did not affect any OPU-IVEP endpoint.  
560 Heifers pre-treated with rhFSH presented a greater proportion of grade I COC  
561 (P=0.0188) and blastocyst rate (P<0.0098). However, this group had less viable COC  
562 (P=0.0264), resulting in a similar (P=0.5869) number of embryos produced by

563 donor/OPU. Pregnancy rate was also similar between control and rhFSH groups (19.3  
564 vs 25.0%,  $P=0.4142$ ). In summary, treatment with a single SC injection of corifollitropin-  
565 alpha was effective to promote superstimulation in calves. However, the potential  
566 benefits of pre-stimulatory protocols using rhFSH have been overshadowed by a  
567 decrease in the total number of viable COC recovered, failing in increase the number  
568 of embryos produced per donor/OPU.

569 **Keywords:** In vitro embryo production, puberty, recombinant gonadotropins, Zebu

570

571

## 572 1. Introduction

573

574 It is well known that calves and pre-pubertal heifers may be used for in vitro  
575 embryo production (IVEP) (Brogliatti et al. 1996[1]; Armstrong et al. 1997[2]; Majerus  
576 et al. 1999[3]). However, the selection of potential donors based on phenotype and  
577 production traits hastened the use of calves in animal breeding programs, particularly  
578 considering the lower developmental potential of the oocytes recovered and  
579 consequent lower IVEP from such animals (Revel et al. 1995[4]; Salamone et al.  
580 2001[5]). The recent development of genome selection (Jiang et al. 2019[6]) boosted  
581 the demand for the use of calves as oocyte donors, and thus the development of  
582 strategies and protocols to increase blastocyst rates.

583 Pre-stimulatory protocols using porcine FSH (pFSH) have been proposed to  
584 improve oocyte yield and in vitro embryo production from calves (Armstrong et al. 1994  
585 [7]; Landry et al. 2016[8]; Baldassare et al. 2018[9]). However, results are still  
586 inconclusive (Fry 2020[10]). This inconsistency can be partially explained by the fact  
587 that pFSH is extracted and purified from hypophyses recovered at slaughterhouse,  
588 which results in significant variation in biological activity from batch to batch (Murphy  
589 et al. 1984[11]). Moreover, due to its short half-life, treatments with pFSH usually  
590 require multiple injections over time, which is both labor-demanding and stressful for  
591 the calves. In this regard, evidences that long-stimulatory protocols could improve the  
592 developmental competence of oocytes from calves (Currin et al. 2017[12]) foster the  
593 demand for new ways to simplify treatment schedules.

594 The development of an alternative protocol for superstimulating with a single  
595 treatment has long been pursued by researchers (Bó et al. 2018[13]). The use of eCG  
596 (Sendag et al. 2008[14]), pFSH diluted in slow releasing vehicles such as hyaloronan

597 (Vieira et al. 2016[15]; Ongaratto et al. 2020[16]), and even alternative injection sites  
598 (Sakaguchi et al. 2018[17]), have been evaluated in pubertal cattle. In the human  
599 medicine, a long-acting recombinant FSH (rhFSH) molecule (corifollitropin-alpha) was  
600 engineered by the combination of the alpha and beta aminoacid chains of the FSH,  
601 aiming to improve patient wellbeing by reducing the number of injections required to  
602 obtain ovarian superstimulation (Ben-Menahem 2018[18]). To our best knowledge, this  
603 molecule has not been tested in cattle yet.

604 Thus, we hypothesized that 1) a single SC injection of corifollitropin-alpha can  
605 be used to promote ovarian superstimulation in calves, and 2) this treatment improves  
606 embryo yield in calves and prepubertal heifers used as oocyte donors for IVEP. The  
607 aims of this study were to evaluate the route of administration on the ovarian follicular  
608 response to corifollitropin-alpha, and the effects of different pre-stimulatory protocols  
609 using rhFSH on OPU and IVEP outcomes in prepubertal cattle.

610

## 611 **2. Material and Methods**

612 Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich  
613 (St. Louis, MO, USA).

614

### 615 **2.1. Animals and location**

616 The study was performed at the Embrapa's Experimental Station in Planaltina,  
617 DF, and in the private commercial farms Agropecuária GA, in Damianópolis, GO  
618 (14°28'58.2"S 46°18'13.3"W) and JBS Agropecuária, Posse, GO, Brazil. Prepubertal  
619 Nelore (*Bos taurus indicus*) calves (circa 6 to 8 months old, n=100) and heifers (12  
620 months old, n=60) were used. All animals were raised on Brachiaria SP pasture with  
621 ad libitum access to water and minerals. The experimental procedures were conducted

622 in accordance with the Brazilian Ethics, Bioethics, and Animal Care Committee  
623 (CEBEA) guidelines and were approved by the Embrapa's Ethics in the Use of Animals  
624 Committee (Protocol CEUA-800-4372/2020).

625

## 626 2.2. Experimental design

627 This study was subdivided in three experiments. Experiment 1 evaluated  
628 the effect of the route of administration on the ovarian follicular response to a long-  
629 acting human recombinant FSH (rhFSH, corifollitropin-alpha, Elonva, Shering-Plough,  
630 Brazil). Due to the lack of previous information regarding the use of corifollitropin in  
631 cattle, we run a preliminary dose-response trial run to define the doses to be used. The  
632 calves (n=10, 205.6±4.0 days of age and 175.4±5.2 Kg body weight) were randomly  
633 allocated to receive 0 to 22.5 mcg, with 2.5 mcg increments, of rhFSH, diluted in 1 mL  
634 saline and injected via im (0 h). Ovarian follicular development was monitored daily, by  
635 ultrasonography, for five days. The average follicle diameter at 120 h was considered  
636 to define the dose (10 mcg) to be used in subsequent experiments. The calves were  
637 then randomly allocated to receive 10 mcg rhFSH either SC (n=5) or IM (n=5). Follicle  
638 development was monitored by daily ultrasonography, during five days, and compared  
639 between groups. At 120 h, samples of follicular fluid were collected by transvaginal  
640 ultrasound-guided follicle aspiration and stored for further estradiol (E2) analysis by  
641 electrochemiluminescence (ECL).

642 In Experiment 2, we evaluated oocyte recovery and in vitro embryo production  
643 (IVEP) in Nelore calves previously submitted to ovarian stimulation with 10 mcg SC  
644 rhFSH and undergoing OPU after a conventional (96 h) or a long interval (120 h) after  
645 treatment. Calves receiving no pre-treatment or 300 IU IM eCG (Novormon, Zoetis,  
646 São Paulo, Brazil) at the same intervals (96 and 120 h) were used as negative and

647 positive controls, respectively. The calves (n=90, approximately 240 days of age) were  
648 randomly allocated into 5 groups: 1) control (CG), no pre-stimulation; 2) rhFSH-96h:  
649 rhFSH and OPU 96h later; 3) rhFSH-120h: rhFSH and OPU 120h later; 4) eCG-96h:  
650 eCG and OPU 96h later; 5) eCG-120h: eCG and OPU 120h later. As the stimulation  
651 protocols started on the same day, the control group was subdivided (n=15+15) to be  
652 aspirated at 96 h or 120 h. Nelore mature cows (n=10) were used as a reference for  
653 IVEP outcomes. Ovaries were considered as superstimulated if average follicle size at  
654 OPU was >7 mm. OPU and IVEP were performed by the same team of technicians,  
655 using standard commercial procedures.

656 In Experiment 3, we evaluated oocyte yield, IVEP and subsequent pregnancy  
657 rates in Nelore prepubertal heifers submitted to ovarian stimulation with 10 mcg SC  
658 rhFSH. The heifers (n=60, 12.7±0.1 months old and 326.1±4.7 Kg body weight) were  
659 randomly allocated into three groups: 1) control (CG), no pre-stimulation; 2) rhFSH-  
660 72h: rhFSH and OPU 72h later; and 3) rhFSH-96h: rhFSH and OPU 96h later. The  
661 control group was subdivided (n=15+15) to undergo OPU at the same moment of  
662 rhFSH-72h or rhFSH-96 h, as described in Exp. 2. Embryos produced were  
663 cryopreserved by vitrification, and later thawed and transferred to previously  
664 synchronized recipients. OPU, IVEP and embryo transfers (ET) were performed by the  
665 same team of technicians.

666

### 667 2.3. Ultrasonography and oocyte recovery

668 In Experiment 1, the sonographic exams were performed using a portable  
669 ultrasound device equipped with a 7.5 MHz linear rectal probe or (MyLab 30 Gold Vet,  
670 Esaote, Genova, Italy). Two calves had a narrow pelvis and rectal manipulation of the  
671 ovaries were not possible, in these animals the ultrasound probe was mounted in a

672 plastic guide and the exam was done as described for small ruminants. In the  
673 remaining calves, ovarian scans were performed as routinely done for cows. A  
674 videoclip of each ovary was recorded and later used to measure the number and size  
675 of all follicles >1.5 mm. The collection of follicular fluid samples was performed using  
676 an 8.0 MHz micro-convex human vaginal probe and an adapted OPU guide. Vacuum  
677 was generated using a 20 mL syringe and the fluid was recovered in 1.5 mL Eppendorf  
678 tubes.

679 In Experiments 2 and 3, OPU were done using a portable ultrasound equipped  
680 with 6.5 MHz micro-convex probe (DP 30, Mindray, São Paulo, SP, Brazil) mounted in  
681 a polyethylene aspiration handle made for heifers (WTA Tecnologia Aplicada,  
682 Cravinhos, Brazil). Due to the low stature of the calves, a platform was placed in the  
683 squeeze chute floor. Before OPU, the ovaries were scanned and those presenting an  
684 average follicle size > 7 mm were subjectively classified as superstimulated. The  
685 presence of mucus in the uterine or vaginal lumen was also recorded. Sonographic  
686 visible follicles were then aspirated using 20 G threaded needles (WTA Tecnologia)  
687 and a vacuum pressure of 80 mm/Hg. The aspirated fluid was recovered into 50 mL  
688 tubes (Corning, Acton, MA, EUA) containing DPBS supplemented with 1% FCS and  
689 125 IU/mL of sodium heparin. COC quality was evaluated under a stereomicroscope  
690 at 40 X magnification and those morphologically classified as viable were transferred  
691 to 1.2 mL cryotubes (Corning, New York, USA) containing maturation medium and  
692 transported in a portable incubator (WTA Tecnologia) at 38°C to the IVEP laboratory  
693 (Bio Biotecnologia da Reprodução, Brasília, DF, Brazil).

694

695 2.4. In vitro embryo production (IVEP) and cryopreservation

696 The general protocols used for IVEP in this study were described elsewhere  
697 (Malard et al. 2020[2019]). Briefly, the COC collected from each donor were in vitro  
698 matured for 20 h in TCM199 (Gibco, New York, USA) supplemented with 0.05 IU/mL  
699 FSH (Pluset, Hertape-Calier, Barcelona, Spain), 1 mg/mL estradiol, and 10% FCS.  
700 Expanded COC were then partially denuded and transferred to Tyrode's albumin  
701 lactate pyruvate (TALP) medium supplemented with 10 µg/mL heparin, 20 µM D-  
702 penicillamine, 10 µM hypotaurine, and 1 µM epinephrine, and co-incubated with 1 x  
703 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL for 18 h to be fertilized. Semen from a single Nelore sire was  
704 used in all fertilization batches. Presumptive zygotes were cultured in 50 µL droplets  
705 of synthetic oviduct fluid (SOFaa) supplemented with essential and non-essential  
706 amino acids, 0.34 mM sodium tricitrate, 2.77 mM myo-inositol, and 10% FCS under  
707 mineral oil. Cleavage and blastocyst rates were determined at 72 and 168 h post-  
708 insemination. In vitro maturation, fertilization and culture took place in a humidified  
709 incubator at 5% CO<sub>2</sub> in air and 38.5 °C. Blastocysts produced at day 7 were  
710 cryopreserved by the slow freezing method, following the standard procedures of the  
711 laboratory.

712

## 713 2.5. Embryo cryopreservation, thawing, and transfer

714 Embryos were transferred immediately after thawing (direct transfer) to  
715 previously synchronized crossbred recipients in a commercial farm (Fazenda  
716 Macaúba, (14°29'31.39"S 46°40'53.88"W) Posse, GO, Brazil). The synchronization  
717 protocol consisted of the insertion of an intravaginal progesterone device (1.0 g, Repro  
718 Neo, GlobalGen, Jaboticabal, SP, Brazil) and injection of 2 mg estradiol benzoate IM  
719 (Gonadiol, GlobalGen) at day -8; removal of the device and injection of 0.526 mg  
720 sodium cloprostenol (Induscio, GlobalGen), 200 IU eCG (eCGen, GlobalGen) at day -



721 2, and 0.5 mg estradiol cypionate (Cipion; GlobalGen) at day 0 (expected ovulation).  
722 Suitable recipients were selected based on the presence and location (right or left) of  
723 a corpus luteum at day 7. Embryos were non-surgically transferred to the uterine horn  
724 ipsilateral to the CL. Pregnancy was diagnosed 23 days later by ultrasonography  
725 (Mindray).

726

## 727 2.6. Hormonal assays

728 Follicular fluid samples were centrifuged at 1,500 X g for 20 min under  
729 refrigeration (5oC), transferred to 1.5 mL microtubes, and stored at -80oC until  
730 analysis. Follicular fluid concentrations of estradiol were determined using an  
731 electrochemiluminescence commercial kit (Immulite Estradiol, Siemens, Llanberis,  
732 UK) at a commercial veterinary analysis laboratory (Évora, Brasília, DF, Brazil). Inter-  
733 and intra-assay coefficients of variation were xxx% and xxx%, respectively.

734

## 735 2.7. Data analysis

736 In Experiment 1, data on the follicle diameter were tested for type of distribution  
737 using the Univariate Procedure of SAS and compared among doses or between  
738 injection routes using the Glimmix procedure of SAS (SAS Studio 3.8, University  
739 Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with a repeated statement to account for  
740 measurements over time. The model included the effects of route (IM or SC), time  
741 (hours after treatment), and their interactions. In Experiment 2, OPU and IVEP  
742 endpoints were compared among experimental groups using the Glimmix procedure  
743 of SAS. The model was adjusted for the type of distribution of each variable (gamma  
744 for grade I COC, lognormal for viable COC, gaussian for the remaining). Binomial  
745 variables such as cleavage and blastocyst rates were compared by the Chi-squared

746 method, using the Frequency Procedure of the SAS. In Experiment 3, data was tested  
 747 for type of distribution and initially analyzed as a 2x2 factorial (OPU at 72 or 96 h x use  
 748 or not of rhFSH). As there was no effect of the moment of OPU, data were pooled  
 749 according to the use of pre-stimulation (control or rhFSH), and analyzed using the  
 750 MIXED Procedure of SAS and Tukey's as a post hoc test. Binomial variables were  
 751 compared by the Chi-squared method, as previously described. Results are shown as  
 752 mean±SEM.

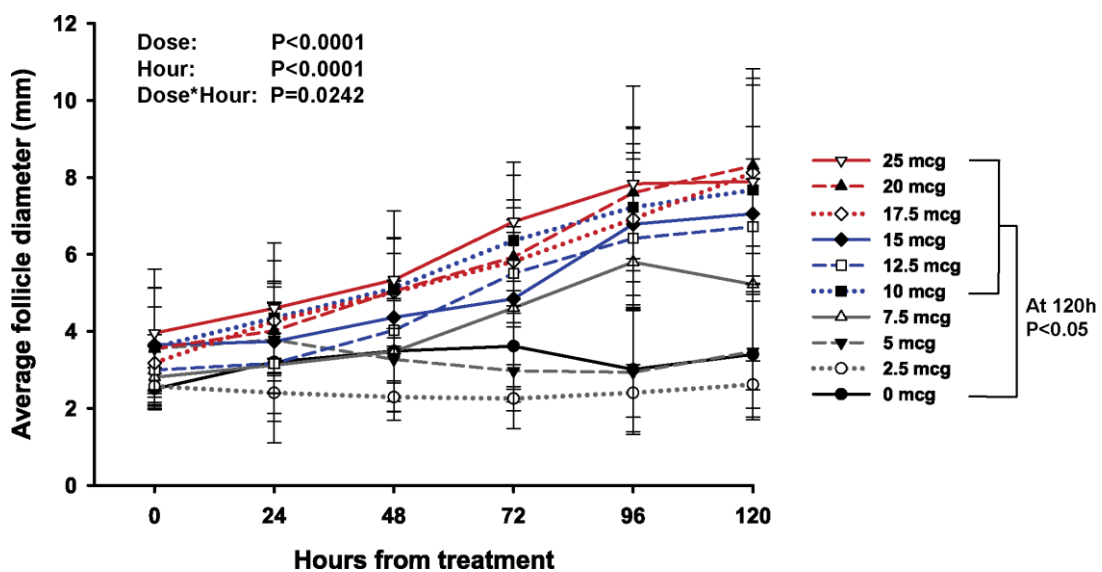
753

754 **3. Results**

755 3.1 Experiment 1

756 In the dose-response trial, a consistent ovarian response (mean follicle diameter > 6  
 757 mm 96h after treatment) was obtained with all doses greater than 10 mcg, whereas  
 758 lower doses resulted in a mean follicle diameter similar (P>0.05) to control (0 mcg), as  
 759 shown in Figure 1. Therefore, this dose was chosen to be used in the subsequent  
 760 experiments.

761



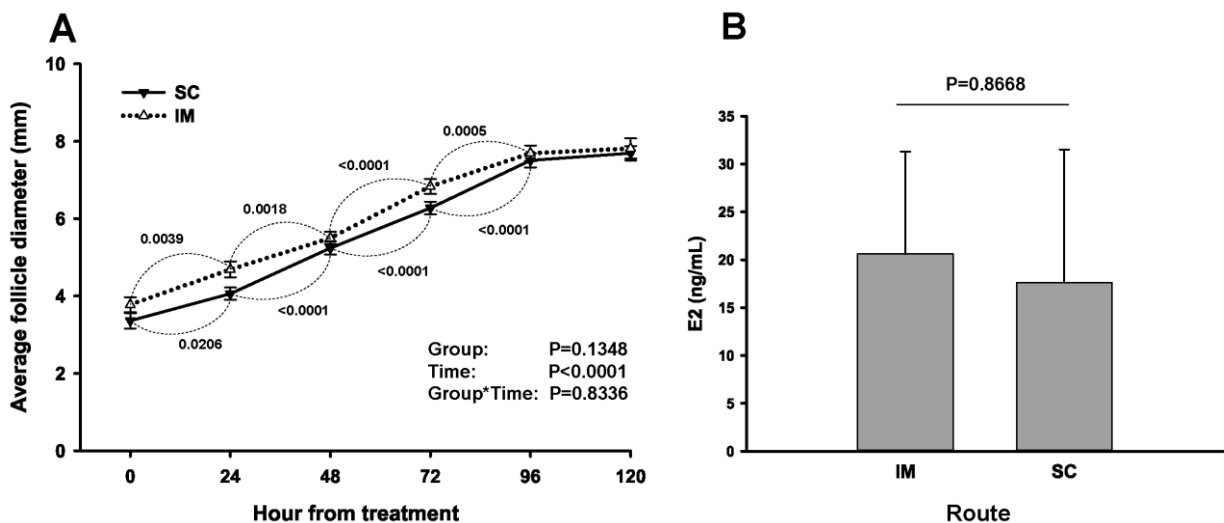
762

763 Figure 1. Changes in follicle diameter over time in a dose-response superstimulation  
 764 trial with rhFSH (corifollitropin-alpha) in Nelore (*Bos taurus indicus*) calves. After 120  
 765 h, follicle diameter in calves treated with  $\geq 10$  mcg rhFSH was greater ( $P < 0.05$ ) than  
 766 in the control group.

767

768 When we compared the administration of rhFSH via SC or IM, there was no  
 769 effect of route ( $P = 0.1348$ ) nor an interaction route x time ( $P = 0.8336$ ) (Fig. 2). Time  
 770 after treatment affected follicle growth in both groups ( $P < 0.0001$ ), with the average  
 771 follicle diameter increasing from  $3.6 \pm 0.1$  to  $7.6 \pm 0.1$  mm at 0h to 96h (growth rate  
 772  $1.0 \pm 0.1$  mm/day). Thereafter, follicle development stabilized and no further growth  
 773 occurred from 96h to 120h ( $7.6 \pm 0.1$  vs.  $7.8 \pm 0.1$  mm;  $P > 0.05$ ). Samples of follicular fluid  
 774 collected at 120 h presented similar ( $P > 0.05$ ) estradiol concentrations between groups.

775



776

777 Figure 2 A, B. Effect of the route of administration (SC or IM) of rhFSH on ovarian  
 778 stimulatory response in Nelore (*Bos taurus indicus*) calves. A) Average follicle diameter  
 779 over time; B) Intrafollicular estradiol (E2) concentrations 120 h after treatment.

780

781 3.2 Experiment 2

782           The OPU-IVEP outcomes are summarized in Table 1. There was no difference  
783 in data from controls calves undergoing OPU Only calves receiving rhFSH presented  
784 effective ovarian superstimulation ( $P<0.0001$ ). Vaginal mucus discharge was more  
785 frequently observed for FSH-120 calves than FSH-96, eCG-96 or eCG-120  
786 ( $P<0.0001$ ). The use of rhFSH increased the proportion of grade I COC compared with  
787 eCG or controls ( $P<0.0001$ ). However, rhFSH also increased the proportion of  
788 expanded COC ( $P<0.0001$ ), resulting in a lower proportion of viable COC in rhFSH-  
789 treated groups ( $P<0.0001$ ). Moreover, total COC were lesser for FSH120 compared  
790 with calf control ( $P=0.0034$ ), though similar ( $P>0.05$ ) to the other groups. Data on IVEP  
791 of FSH96 COC was discarded due to contamination during IVEP. Blastocyst rate using  
792 mature cows COC was similar to FSH120 (54.5% vs 41.4%;  $P>0.05$ ), but greater than  
793 eCG-96, eCG-120 and CG ( $P<0.01$ ).

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805 Table 1. OPU-IVEP outcomes in Nelore (*Bos taurus indicus*) calves submitted or not  
 806 to previous stimulation protocols with rhFSH (corifollitropin-alpha) or eCG. Multiparous,  
 807 non-stimulated and non-synchronized adult cows were used as controls.

Endpoint	Group						P-value
	Control calves	rhFSH-96h	rhFSH-120h	eCG-96h	eCG-120h	Control cows	
OPU (n)	32	15	13	15	15	10	
Total COC	21.6±1.9a	17.7±2.6a	9.3±1.2b	16.1±3.5ab	15.7±2.2ab	17.9±2.6a	0.0167
COC Grade I	3.0±0.6b	6.7±1.4a	2.3±0.8b	1.7±0.5b	2.1±0.9b	2.1±0.8b	0.0025
COC Grade I (%)	16.4c	52.4a	37.0b	12.3c	15.3c	20.4c	<0.0001
COC Grade II	15.4±1.5a	6.1±1.1c	4.1±1.1c	12.4±3.2ab	11.8±1.8ab	8.2±0.6bc	<0.0001
Viable COC	18.4±1.8a	12.7±2.0bc	6.2±1.2c	14.1±3.4ab	13.9±2.1ab	10.3±1.1bc	0.0033
Viable COC (%)	85.5a	71.8b	66.9b	88.0a	88.6a	57.5c	<0.0001
Denuded	0.4±0.2	0.7±0.3	0.2±0.2	0.2±0.1	0.3±0.2	0.1±0.1	0.5297
Degenerated	2.3±0.3b	2.5±0.7b	0.8±0.3b	1.3±0.3b	1.7±0.3b	7.5±1.9a	<0.0001
Expanded COC	0.0±0.0b	1.8±0.6a	2.1±0.5a	0.3±0.3b	0.3±0.3b	0.0±0.0b	<0.0001
Expanded COC (%)	0.0c	10.2b	22.3a	1.7c	1.7c	0.0c	<0.0001
Superstimulation (%)	0.0b	100.0a	92.3a	13.3b	0.0b	0.0b	<0.0001
Presence of mucus (%)	0.0c	20.0b	69.2a	6.7bc	20.0b	0.0c	<0.0001
Clivage rate (%)	73.0a	*	84.5a	68.1b	58.4b	86.4a	<0.0001
Blastocyst rate (%)	35.4b	*	41.4ab	30.8bc	24.9c	54.5a	0.0088

808 \* Data lost due to contamination during in vitro culture.

809 <sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts, in the same row, differ (P<0.05)

810

### 811 3.3 Experiment 3

812 There was neither difference (P>0.05) between control heifers undergoing OPU  
 813 at 72 h or 96 h, nor between groups rhFSH-72 or rhFSH-96. Thus, data from 72 h and  
 814 96 h was pooled for heifers receiving (rhFSH) or not (Control) ovarian pre-stimulation.  
 815 Treatment with rhFSH increased (P<0.05) the proportion of Grade I COC and  
 816 blastocyst rates. However, there was a trend (P<0.07) towards decreasing the total

817 number of COC retrieved, as well as a reduction ( $P<0.05$ ) in the number of viable COC  
 818 and of cleaved zygotes, resulting in a similar ( $P>0.05$ ) number of blastocysts produced  
 819 per donor/OPU.

820

821 Table 2. OPU-IVEP outcomes in prepubertal Nelore (*Bos taurus indicus*) heifers  
 822 submitted or not to previous stimulation protocols with rhFSH (corifollitropin-alpha).

Endpoint	Control	rhFSH	P-value
OPU (n)	30	30	--
Total COC	18.7±3.0	12.0±1.3	0.0648
COC Grade I	3.5±0.7	4.1±0.6	0.5718
COC Grade I (%)	18.8±2.9 (111/599)	35.3±4.2 (115/335)	0.0188
COC Grade II	11.1±2.4	3.8±0.6	0.0076
Viable COC	14.6±2.6	7.9±0.9	0.0264
Viable COC (%)	76.0±2.6 (466/599)	66.0±3.5 (221/335)	0.0149
Degenerated	4.2±0.6	4.1±0.7	0.9954
Cleavage	11.7±1.8	6.8±0.8	0.0284
Cleavage rate (%)	81.1±4.8 (374/466)	83.0±3.9 (184/221)	0.8572
Blastocysts	2.8±0.7	2.3±0.4	0.5869
Blastocyst rate (%)	16.4±2.9 (88/466)	31.6±4.8 (62/221)	0.0098
Pregnancy rate (%)	19.3 (16/83)	25.0 (15/60)	0.4142

823

824

#### 825 4. Discussion

826 Although the demand for the use of calves as oocyte donors has increased in  
 827 the past few years, IVEP from prepubertal cattle remains a challenge. In the current  
 828 study, we evaluated the use of a long-acting rhFSH (corifollitropin-alpha) as a pre-  
 829 stimulatory treatment in calves. Our results support or hypothesis that a single SC

830 injection of rhFSH would induce ovarian superstimulation. However, our hypothesis that  
831 the use of rhFSH would improve IVEP outcomes was only partially confirmed, as  
832 improvements on oocyte quality and blastocyst rates were counterbalanced by a lower  
833 recovery of COC.

834 To our knowledge, no previous studies tested corifollitropin-alpha for ovarian  
835 stimulation in cattle. Therefore, we first run a curve-response trial to define the doses  
836 to be used in the subsequent experiments. All doses from 10 mcg on resulted in  
837 ovarian superstimulation, characterized by the predominance of large (> 7 mm) follicles  
838 in the ovaries. Moreover, a single injection of such doses promoted a progressive  
839 follicle growth up to 96 h after treatment, similarly to what is observed after multiple  
840 injections of porcine FSH (pFSH) (García-Guerra et al. 2015[20]). Ovarian  
841 superstimulation can be induced in cattle with a single injection using eCG (Sendag et  
842 al. 2008[14]) or pFSH conjugated with a controlled releasing vehicle (Vieira et al.  
843 2016[15]; Ongaratto et al. 2020[16]). However, results tend to be inconsistent,  
844 particularly due to the expected variation among batches of biological extracts.

845 In the current study we demonstrated that the route of administration (IM or SC)  
846 does not interfere in the superstimulatory effects of rhFSH in cattle. Thus, the SC route  
847 could be used in this species, similarly to what is done in humans (Pouwer et al.  
848 2015[21]). In this regard, the use of a single, SC injection of rhFSH is an alternative to  
849 reduce labor and animal stress during the preparation of donors for OPU, particularly  
850 in *Bos indicus* breeds. In fact, the concern with patient wellbeing was one of the  
851 reasons for the development of long-acting rhFSH (Huang et al. 2018[22]). Animals  
852 under stress have higher plasma cortisol concentrations (Dobson & Smith 2000[23]),  
853 which negatively impact reproduction. Moreover, in large-scale IVEP programs

854 enrolling tens of donors, pre-stimulatory treatments based on multiple FSH injections  
855 may be simply not feasible.

856 Donor stimulation with FSH before OPU was shown to improve blastocyst rates  
857 (Fry 2020[10]), and similar protocols have been used in prepubertal cattle (Baldassarre  
858 et al. 2018[9]). However, in both cases previous evidences suggest better results are  
859 obtained with longer stimulation protocols (Nivet et al. 2012[24]; Dias et al. 2018[25];  
860 Krause et al. 2020[26]). In this regard, we investigated whether the Corifollitropin could  
861 be used to increase the interval between treatment and OPU, whereas avoiding  
862 multiple injection schedules. Our results demonstrate that the rhFSH resulted in more  
863 calves superstimulated at the moment of OPU, when compared to eCG, and that when  
864 COC are aspirated 120 h after the use of a long-acting FSH, blastocyst rates are similar  
865 to those obtained with adult cows. In fact, the higher incidence of expanded COC, as  
866 well as of mucus, suggest higher estradiol and LH concentrations. Such endocrine  
867 status is observed close to the moment of ovulation (Mihm & Bleach 2003[27]), when  
868 oocytes achieve the later stages of maturation and greater developmental potential  
869 (Walker & Biase 2020 [28]). Coherently, in Experiment 1 we observed a stabilization  
870 in follicular diameter after 96 h, as previously reported for preovulatory follicles in  
871 Nelore (Figueiredo et al. 1997[29]). However, the rhFSH-120h group also yielded less  
872 total and viable COC than the calf control group, what overshadowed the potential  
873 benefits of this protocol. Due to the number of donors used in this experiment (n=90),  
874 it was not possible to individually measure AFC and, thus, to calculate the recovery  
875 rate after OPU. Nevertheless, it is likely that a low recovery rate was the main cause  
876 of the difference in the number of COC collected from this group. Oocyte recovery  
877 decreases as follicle size increase (Seneda et al. 2001[30]). Additionally, cumulus



878 expansion is known to make COC more prone to stick in the aspiration line or in the  
879 filter and therefore to be lost during manipulation.

880         Due to the possibility of reduction in recovery rate after long-stimulatory  
881 protocols, we designed Experiment 3 to evaluate the effect of rhFSH in prepubertal  
882 heifers using shorter (72 h or 96 h) treatment to OPU intervals. According to the results  
883 of Experiment 1, follicles were expected to be in the growing phase during this time-  
884 window. In fact, we observed no differences in OPU-IVEP endpoints between heifers  
885 collected at 72 h or 96 h, and data were pooled for the control and rhFSH groups. As  
886 observed for calves, rhFSH pre-treatment increased the proportion of grade I oocytes  
887 and blastocyst rates in prepubertal heifers. Once again, however, the use of rhFSH  
888 was associated with a reduction in the number of viable oocytes recovered, resulting  
889 in a lack of difference in the number of blastocysts produced by donor/OPU.

890         In summary, our results show that a single, SC injection of Corifollitropin-alpha  
891 promotes consistent ovarian follicle superstimulation in calves, with follicle growth  
892 being observed up to 96 h after treatment, and thus can be an alternative for priming  
893 of oocyte donors. We also demonstrated the potential benefits of rhFSH treatment  
894 before OPU on oocyte quality and subsequent blastocyst rates, but also highlight that  
895 adaptations in the aspiration procedure are necessary in order to avoid a drop in oocyte  
896 recovery rates, particularly if long protocols are to be used.

897

#### 898 **Declaration of competing interest**

899         The authors declare that there are no conflicts of interest.

900

#### 901 **Credit Author Statement**

902 RMM: investigation, writing – original draft; CACF, LGB, RAF:  
903 conceptualization, methodology, manuscript review; CFM, MASP, MCX:  
904 investigation; JHMV: conceptualization, funding acquisition, supervision, data  
905 analysis, writing & manuscript review.

906

## 907 **Acknowledgements**

908 The authors thank the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal  
909 (FAPDF) and the Graduate Program from the University of Brasília for the financial  
910 support. We also thank the staff from Bio Biotecnologia LTDA for the collaboration in  
911 this project, and the Agropecuárias GA and JBJ for supplying the animals and  
912 infrastructure for the Experiments 2 and 3. RMM received a grant from the  
913 Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

914

## 915 **5. References**

- 916 [1] Brogliatti GM, Adams GP. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in  
917 prepubertal calves. *Theriogenology* 1996; 45:1163-1176. doi: 10.1016/0093-  
918 691x(96)00072-6
- 919 [2] Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR. Advances in production of embryos in vitro  
920 from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev*  
921 1997; 9(3):333-9. <https://doi.org/10.1071/r96080>.
- 922 [3] Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, et al. Embryo  
923 production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty.  
924 *Theriogenology*. 1999; 52: 1169-1179. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00209-5

- 925 [4] Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental  
926 capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of  
927 cows. *J Reprod Fertil* 1995; 103(1):115-20. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030115>.
- 928 [5] Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT. Biochemical and  
929 developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is  
930 compromised. *Biol Reprod* 2001; 64(6):1761-8.  
931 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1761>.
- 932 [6] Jiang J, Ma L, Prakapenka D, VanRaden PM, Cole JB, Da Y. A large-scale genome-  
933 wide association study in US Holstein cattle. *Front genet* 2019; 10: 412.  
934 <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00412>
- 935 [7] Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF. Gonadotropin  
936 stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from  
937 calf oocytes. *Theriogenology* 1994;42:1227-36. [https://doi.org/10.1016/0093-  
938 691x\(94\)90871-0](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90871-0).
- 939 [8] Landry DA, Bellefleur AM, Labrecque R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Sirard  
940 MA. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes  
941 obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*  
942 2016;86:1240-6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.064>.
- 943 [9] Baldassarre H, Currin L, Michalovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Mondadori RG,  
944 Glanzner WG, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, Lopez R, Grand FX, Vigneault  
945 C, Blondin P, Gourdon J, Bordignon V. Interval of gonadotropin administration for  
946 in vitro embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2  
947 and 6 months of age by repeated laparoscopy. *Theriogenology* 2018; 116:64-70.  
948 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.005>.

- 949 [10] Fry RC. Gonadotropin priming before OPU: What are the benefits in cows and  
950 calves? *Theriogenology*. 2020 Jul 1;150:236-240. doi:  
951 10.1016/j.theriogenology.2020.01.068.
- 952 [11] Murphy B, Mapletoft R, Manns J, Humphrey W. Variability in gonadotrophin  
953 preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*  
954 1984;21:117-125. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90311-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90311-X)
- 955 [12] Currin L, Michalovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Glanzner W, Schuermann Y,  
956 Bohrer RC, Dicks N, da Rosa PR, De Cesaro MP, Lopez R, Grand FX, Vigneault C,  
957 Blondin P, Gourdon J, Baldassarre H, Bordignon V. The effect of age and length of  
958 gonadotropin stimulation on the in vitro embryo development of Holstein calf  
959 oocytes. *Theriogenology* 2017; 104:87-93.  
960 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.011>.
- 961 [13] Bó GA, Rogan DR, Mapletoft RJ. Pursuit of a method for single administration of  
962 pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*  
963 2018;112:26-33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>.
- 964 [14] Sendag S, Cetin Y, Alan M, Hadelers KG, Niemann H. Effects of eCG and FSH on  
965 ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by  
966 ovum pick-up in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2008;106(1-2):208-14.  
967 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.007>.
- 968 [15] Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Freitas  
969 BG, Bragança LGM, Marques KNG, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli  
970 PS. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior  
971 to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*. 2016;85:877-886.  
972 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.036>.

- 973 [16] Ongaratto FL, Cedeño AV, Rodríguez-Villamil P, Tríbulo A, Bó GA. Effect of FSH  
974 treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo  
975 production in beef donor cows. *Anim Reprod Sci* 2020;214:106274.  
976 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>.
- 977 [17] Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. Effect of a  
978 single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae  
979 on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black  
980 cows. *J Reprod Dev* 2018;64(5):451-455. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-007>.
- 981 [18] Ben-Menahem D. Preparation, characterization and application of long-acting FSH  
982 analogs for assisted reproduction. *Theriogenology* 2018; 112:11-17.  
983 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.020>.
- 984 [19] Malard PF, Peixer MAS, Grazia JG, Brunel HDSS, Feres LF, Villarroel CL,  
985 Siqueira LGB, Dode MAN, Pogue R, Viana JHM, Carvalho JL. Intraovarian injection  
986 of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in  
987 a bovine model of fertility loss. *Sci Rep* 2020;10(1):8018.  
988 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>.
- 989 [20] García Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J, Mapletoft RJ.  
990 Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles  
991 within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology*  
992 2015;84:467-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.037>.
- 993 [21] Powner AW, Farquhar C, Kremer JA. Long-acting FSH versus daily FSH for  
994 women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jul  
995 14;(7):CD009577. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009577>.
- 996 [22] Huang CY, Chen GY, Shieh ML, Li HY. An extremely patient-friendly and efficient  
997 stimulation protocol for assisted reproductive technology in normal and high

998 responders. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):18.  
999 <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0335-0>.

1000 [23] Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim*  
1001 *Reprod Sci* 2000;60-61:743-52. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00080-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00080-4).

1002 [24] Nivet AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA.  
1003 FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine  
1004 model. *Reproduction* 2012;143(2):165-71. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0391>.

1005 [25] Dias FCF, Khan MIR, Sirard MA, Adams GP, Singh J. Transcriptome analysis of  
1006 granulosa cells after conventional vs long FSH-induced superstimulation in cattle.  
1007 *BMC Genomics* 2018;19(1):258. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4642-9>.

1008 [26] Krause ART, Dias FCF, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J. Effect of dose and  
1009 duration of FSH treatment on ovarian response in prepubertal calves. *Anim Reprod*  
1010 *Sci* 2020;219:106471. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106471>.

1011 [27] Mihm M, Bleach EC. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in  
1012 cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3-4):217-37. [https://doi.org/10.1016/s0378-](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00092-7)  
1013 [4320\(03\)00092-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00092-7).

1014 [28] Walker BN, Biase FH. The blueprint of RNA storages relative to oocyte  
1015 developmental competence in cattle (*Bos taurus*). *Biol Reprod* 2020;102(4):784-  
1016 794. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa015>.

1017 [29] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JM. Ovarian follicular dynamics in  
1018 Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 1997;47(8):1489-505.  
1019 [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00156-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00156-8).

1020 [30] Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. Relationship between  
1021 follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*  
1022 2001;67(1-2):37-43. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00113-0).

1023 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1024

1025           Diante de todo o exposto e ao longo dos experimentos e objetivos deste  
1026 trabalho, é possível afirmar que a alfacorifolitropina é uma molécula de aplicação única  
1027 capaz de promover a estimulação e crescimento folicular em bezerras assim como os  
1028 protocolos padrões de múltiplas aplicações já estabelecidos. Reduzindo assim, o  
1029 manejo e estresse com esses animais em um protocolo hormonal.

1030           A molécula recombinante de FSH se mostrou eficaz tanto por via IM e SC,  
1031 facilitando a aplicação e manejo dos animais. O rhFSH aumentou a proporção de  
1032 COC grau I em comparação a outros fármacos e grupo controle, no entanto também  
1033 aumentou a proporção de rhFSH expandidos. Houve uma tendência de diminuição do  
1034 número total de COC recuperados em animais tratados com rhFSH.

1035           Por fim, é possível afirmar que o rhFSH é capaz de estimular o crescimento  
1036 folicular e melhorar a proporção de oócitos grau I. Sendo necessário ainda ajustes no  
1037 momento da OPU para melhoria nas taxas de recuperação. O tratamento com rhFSH  
1038 é vantajoso em comparação aos demais por necessitar de aplicação única.

1039

1040 **ANEXOS**

1041 1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA CERRADOS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estratégias de antecipação da reprodução de bovinos de corte: otimização de biotécnicas para multiplicação de bezerras e novilhas", registrada com o n°. 800-4372-1/2020, sob a responsabilidade de Carlos Frederico Martins - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA Embrapa Cerrados (CEUA/Cerrados), em 13/11/2020.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/11/2020 a 01/10/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus indicus</i> - Nelore
Número de animais	110 (cento e dez)
Peso/Idade	7-15 meses / 180 a 300 kg: 80 animais >36 meses / 400-500 kg: 30 animais
Sexo	Fêmea
Origem	Embrapa Cerrados

Brasília, DF, 13 de novembro de 2020.

  
Roberto Guimarães Júnior

Secretário-Executivo da CEUA da Embrapa Cerrados

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA- Embrapa Cerrados  
BR 020 KM 18, Rod. Brasília-Fortaleza 73310-970 Planaltina, DF  
e-mail: [cpac.ceua@embrapa.br](mailto:cpac.ceua@embrapa.br)

<https://www.embrapa.br/grupo/intranet/comissao-de-etica-no-uso-de-animais-ceua>

1042

1043



**EFFECT OF THE ROUTE OF ADMINISTRATION OF RECOMBINANT HUMAN FSH ON OVARIAN SUPERESTIMULATORY RESPONSE IN CALVES**

Autores Rodrigo Martins de Moura <sup>1</sup>, Leticia Prates Martins <sup>1</sup>, Luiz Gustavo Bruno Siqueira <sup>2</sup>, Carlos Antonio Carvalho Fernandes <sup>3</sup>, Carlos Frederico Martins <sup>4</sup>, Ricardo Alamino Figueiredo <sup>5</sup>, Joao Henrique Moreira Viana <sup>1,5</sup>

Instituição <sup>1</sup> UnB - Universidade de Brasília (Brasília - DF), <sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite - Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG), <sup>3</sup> Universidade de Alfenas - Universidade de Alfenas (Alfenas - MG), <sup>4</sup> Embrapa Cerrados - Embrapa Cerrados (Brasília - DF), <sup>5</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - DF)

**Resumo**

A number of pre-stimulatory protocols using porcine FSH (pFSH) have been proposed to improve oocyte yield and *in vitro* embryo production from calves. However, results are still inconclusive. The pFSH is purified from hypophysis recovered at slaughterhouse, which results in significant variation in biological activity between drug batches. Moreover, due to its short half-life, treatments with pFSH usually require multiple injections over time. Recently, long-acting recombinant human FSH (rhFSH) formulations have been developed to induce superstimulation in women using a single-injection. The aim of the present study was to evaluate the effect of treatment route (IM or SC) on ovarian response to long-acting rhFSH in calves. Prepubertal Nelore (*Bos taurus indicus*) calves (N=10) with 205.6±4.0 days of age and 175.4±5.2 Kg of body weight were enrolled. A preliminary dose-response trial was performed to determine the dose to be used in this study as follows. The calves were randomly allocated to receive 0 to 22.5 mcg, with 2.5 mcg increments of rhFSH (Corifollitropin Alpha, Shering-Plough, Brazil), via im. Ovarian follicular development was monitored daily by ultrasonography (MyLab 30 Gold, Esaote, Italy) for five days. A videoclip was recorded from each ovary and used to measure size of individual follicles. A consistent ovarian response (measure the size of individual mean follicle diameter > 6 mm at 96h after treatment) was obtained with doses greater than 10 mcg, whereas lower doses resulted in a mean follicle diameter similar (P>0.05) to control (0 mcg). A subsequent trial has been performed to evaluate the treatment route. The calves were randomly allocated to receive 10 mcg rhFSH either SC (n=5) or IM (n=5). Follicle development was monitored by ultrasonography as previously described. Data was analyzed using the Glimmix Procedure of SAS. We did not observe an effect of route (P=0.1348) nor an interaction route x time (P=0.8336). Time after treatment affected follicle growth in both groups (P<0.0001), with the average of follicle diameter increasing from 3.6±0.1 to 7.6±0.1 mm from 0h to 96h (growth rate 1.0±0.1 mm/day). Thereafter, follicle development stabilized and no further growth occurred from 96h to 120h (7.6±0.1 vs. 7.8±0.1 mm; P>0.05). In summary, the SC route can be successfully used to induce ovarian superstimulation in calves treated with a single dose of long-acting rhFSH.