



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RESPOSTA A DIFERENTES FORMAS  
SINTÉTICAS DE GnRH NA ESPÉCIE  
OVINA**

**RAQUEL GRANDE PEREIRA**

**CHAPECÓ, 2017**

**RAQUEL GRANDE PEREIRA**

**RESPOSTA A DIFERENTES FORMAS SINTÉTICAS DE GnRH NA  
ESPÉCIE OVINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

**Orientador (a): Rogério Ferreira**  
**Co-orientador(s): Julcemar Dias Kessler**

Chapecó, SC, Brasil

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Grande Pereira, Raquel  
Resposta a Diferentes Formas Sintéticas De GnRH  
na Espécie Ovina / Raquel Grande Pereira. - Chapecó  
, 2017.  
44 p.

Orientador: Rogério Ferreira  
Co-orientador: Julcemar Dias Kessler  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do  
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,  
Chapecó, 2017.

1. Análogos GnRH. 2. pico de LH. 3. ovelhas. I.  
Ferreira, Rogério. II. Dias Kessler, Julcemar. ,  
.III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

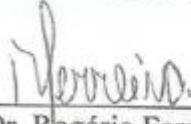
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

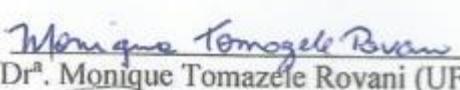
**RESPOSTA A DIFERENTES FORMAS SINTÉTICAS DE GnRH NA  
ESPÉCIE OVINA**

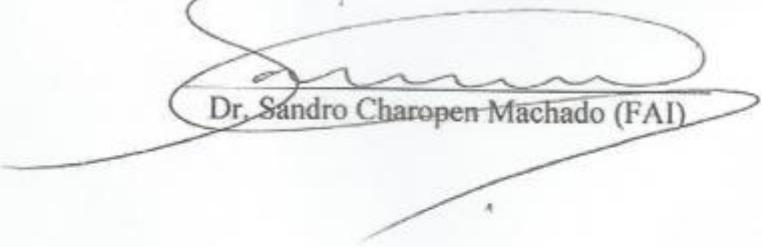
Elaborada por  
**Raquel Grande Pereira**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rogério Ferreira (UDESC)

  
\_\_\_\_\_  
Drª. Monique Tomazete Rovani (UFpel)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sandro Charopen Machado (FAI)

Chapecó, 01 de agosto de 2017.

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço:

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo, muito obrigada. Amo vocês. Sem vocês nada teria sentido!

A minha amada irmã Rafa, muito obrigada por sempre estar ao meu lado.

Ao meu querido cunhado Gustavo.

A minha amada sobrinha Cecília.

Aos amados avôs, sei que onde estiverem, estarão sempre torcendo por mim! Saudades eternas!

Ao meu orientador Dr. Rogério Ferreira. Muito obrigada por ter sido muito mais do que um orientador, mas um “paizão” que sempre esteve disposto a me ajudar e incentivar. Aprendi e aprendo muito com o senhor.

À Cabanha Chapecó, por ter cedido os animais.

À Rosane, por toda ajuda. Muito obrigada!

A Clério A. Hoefle, meu irmão de mestrado e grande amigo.

Aos meus amados amigos, Aninha, Bru Miara, Lucas, Henrique, Myrian, Luquinhas, Gisa, Jessica, Emmano, Flávia, Manu, Gabizinha, Stela, Angelisa, Tadinho e Fabrício. Vocês são uma família que a vida me deu, muito obrigada!

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Animal (GERA).

Ao professor Dr. Thiago El Hadi Perez Fabrega. Muito obrigada por ter me mostrado o universo da pesquisa.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. Todos vocês foram únicos e especiais para mim.

À FAPESC, pela bolsa de estudos.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

## RESPOSTA A DIFERENTES FORMAS SINTÉTICAS DE GnRH NA ESPÉCIE OVINA

AUTOR: RAQUEL GRANDE PEREIRA

ORIENTADOR: ROGÉRIO FERREIRA

Chapecó, 01 de agosto de 2017

O GnRH é um neuro-hormônio hipotalâmico que induz a produção de FSH e produção e liberação de LH pela hipófise anterior. Há formas sintéticas de GnRH que são semelhantes à molécula endógena, como a gonadorelina, e formas que possuem pequenas modificações na sua estrutura molecular (ex: buserelina, lecirelina e deslorelin). Na espécie ovina, há inúmeros trabalhos descritos que utilizam sintéticos de GnRH com o intuito de melhorar a resposta reprodutiva. Entretanto, essas formas sintéticas são utilizadas de maneira completamente empírica, pois não há fórmulas licenciadas que indiquem o uso em ovinos. Além disso, não se sabe o seu potencial de ação hipofisiário na espécie ovina. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de diferentes doses e formas sintéticas de GnRH em induzir a liberação de LH em ovinos. Quarenta ovelhas foram alocadas aleatoriamente em oito tratamentos, de acordo com a forma sintética de GnRH: lecirelina (12,5 ou 25 µg), gonadorelina (50 ou 100 µg), buserelina (4,2 ou 8,4 µg) e deslorelin (375 ou 750 µg). Todas as ovelhas receberam um dispositivo intravaginal de acetato de medroxiprogesterona (MAP; 60 mg) durante 7 dias. Uma dose de PGF<sub>2α</sub> (0,125 mg cloprostenol) foi administrada no dia 5 e o agonista de GnRH foi administrado no dia 7. A liberação de LH foi avaliada até 6 horas após a administração do GnRH. As doses maiores de gonadorelina (100 µg) e buserelina (8,4 µg) induziram a um maior pico de LH às duas horas, comparadas às doses menores (50 e 4,2 µg, respectivamente, para gonadorelina e buserelina,  $P < 0,05$ ). No entanto, para os outros agonistas, a amplitude do pico de LH não foi afetada pela dose ( $P > 0,05$ ). A liberação total de LH (área sob a curva - AUC) após o tratamento com 50 µg de gonadorelina ( $31,7 \pm 5,9$ , ng.h / mL,) foi menor ( $P < 0,05$ ) comparado aos demais tratamentos. No entanto foi igual ( $P > 0,05$ ) a gonadorelina 100 µg. Em conclusão, o presente estudo demonstra que a buserelina, a lecirelina e a deslorelin induziram um efeito maior na liberação de LH do que o tratamento com gonadorelina (50 µg). Acreditamos que os análogos agonistas de GnRH são possivelmente mais eficientes do que a gonadorelina na indução de ovulação. Com base nas doses testadas e considerando a maior liberação de LH, recomendamos o uso de 12,5 µg de lecirelina, 375 µg de deslorelin ou 8,4 µg de buserelina na indução da ovulação na espécie ovina.

**Palavras-chave:** Análogos GnRH, pico de LH, ovelhas

## ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

# RESPONSE TO DIFFERENT SYNTHETIC FORMS OF GnRH IN OVINE

AUTHOR: RAQUEL GRANDE PEIRERA

ADVISER: ROGÉRIO FERREIRA

Chapecó, August 1, 2017

GnRH is a hypothalamic neurohormone that induces the production of FSH and production and release of LH by the anterior pituitary. There are GnRH synthetic forms that are similar to endogenous molecule, such as gonadorelin, and forms that have small changes in its molecular structure (e.g. buserelin, deslorelin and lecirelin). In ovine there are innumerable studies described that use GnRH synthetic in order to improve the reproductive response. However, these synthetic are used of completely empirical way, moreover there are no licensed formulas that are indicated the use in sheep. In addition, its potential pituitary action is not known in ovine. The aim of this study was to evaluate the capacity of different synthetic forms and doses of GnRH in inducing LH release in sheep. Forty ewes were randomly allocated into eight groups, according with the synthetic form GnRH: lecirelin (12.5 or 25 µg), gonadorelin (50 or 100 µg), buserelin (4.2 or 8.4 µg) and deslorelin (750 or 375 µg). All ewes received an intravaginal device of medroxyprogesterone acetate (MAP; 60 mg) for 7 days. A dose of PGF<sub>2α</sub> (0.125 mg cloprostenol) was administered on day 5 and the GnRH was administered on day 7. The serum LH response was evaluated for up to 6 hours after the GnRH administrations. The higher doses of gonadorelin (100 µg) and buserelin (8.4 µg) induced a higher LH peak at two hours than lower doses (50 and 4.2 µg respectively for gonadorelin and buserelin;  $P < 0.05$ ). However, for the other agonists, the amplitude of LH peak was not affected by dose ( $P > 0.05$ ). The total release of LH (area under the curve – AUC) after treatment with 50 gonadorelin ( $31.7 \pm 5.9$ , ng.h/mL,) was lower ( $P < 0.05$ ) than after other treatments. However, it was similar ( $P > 0.05$ ) to the 100 µg gonadorelin. In conclusion, the present experiment shows that buserelin, lecirelin and deslorelin induced a greater effect on LH secretion than gonadorelin treatment. We believe that GnRH analogous are possibly more efficient than gonadorelin in induce ovulation in sheep. Based on doses herein tested and higher LH release, we recommend the use of 12.5 µg lecirelin, 375 µg desorelin or 8.4 µg buserelin in ovulation induction.

**Keywords:** GnRH analogues, LH peak, ewes

## SUMÁRIO

1 CAPÍTULO .....	9
REVISÃO DE LITERATURA .....	9
1.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DOS OVINOS .....	9
1.1.1 Fisiologia reprodutiva do ciclo estral .....	9
1.1.2 Fotoperíodo: Controle do ciclo reprodutivo .....	10
1.1.3 Dinâmica folicular ovariana .....	11
1.2 MECANISMO DA OVULAÇÃO .....	13
1.3 HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA (GNRH) .....	15
1.3.1 Decapeptídeo hipotalâmico .....	15
1.3.2 Mecanismos de ação do GnRH .....	16
1.3.3 Agonistas de GnRH .....	17
1.3.4 Diferentes GnRH utilizados na reprodução animal .....	18
2 CAPÍTULO .....	20
MANUSCRITO .....	20
2.1 MANUSCRITO .....	21
3 CONSIDERAÇOES FINAIS .....	36
4 REFERÊNCIAS .....	37

# 1 CAPÍTULO

## REVISÃO DE LITERATURA

### **1.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DOS OVINOS**

#### **1.1.1 Fisiologia reprodutiva do ciclo estral**

O ciclo estral é caracterizado como o período entre duas ovulações. Durante a época destinada à reprodução na espécie ovina (fotoperíodo negativo) há sucessivos intervalos regulares de estro e ovulação, se não ocorrer a concepção. A duração do ciclo estral pode variar de 15 a 19 dias (DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985). Entretanto, considera-se sua duração como sendo de 17 dias (dia zero = estro). Estes dias são divididos em uma fase luteal que dura entre os dias dois e 13 e uma fase folicular desde o dia 14 até o dia um (DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985).

A fase luteal do ciclo estral é caracterizada como o momento em que há um corpo lúteo (CL) funcional no ovário. Esta estrutura ovariana é originária das células foliculares que se luteinizam e passam a produzir progesterona (P4), após a ovulação. Caso ocorra a concepção, os altos níveis plasmáticos de P4 evitarão que ocorrerão novas ovulações e também manterão a gestação até que a placenta também comece a produzir P4. No entanto, se a fêmea não conceber culminará, então, na regressão lútea do CL, no 14º/15º dia do ciclo estral (para revisão SCARAMUZZI, et al., 1993). Vonnahme, et al (2006) demonstraram que, após um aumento inicial do endotélio vascular, ocorre depois a sua diminuição durante a luteólise. Ou seja, há nas células luteais a diminuição da irrigação vascular induzida pela ação da prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). A fase folicular é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo dominante (FD) até que ocorra a ovulação. Durante essa fase há predominância de 17β estradiol (SCARAMUZZI; CALDWELL; MOOR, 1970), hormônio que é sintetizado nos folículos em crescimento, mas principalmente pelo FD.

Endocrinologicamente, o ciclo estral é regido, basicamente, pela ação dos hormônios: GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas), FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante), estradiol e progesterona. O GnRH é responsável pela síntese FSH e a síntese e secreção do LH. O FSH atua sobre os ovários através da estimulação do desenvolvimento folicular ovariano. A sua produção é

regulada pela ação do estradiol e a inibina, hormônios que atuam a nível hipofisiário (BAIRD, et al., 1991). Ambos os hormônios são oriundos das células da granulosa de grandes folículos antrais. O LH é responsável pela maturação final do FD e sua ovulação. Em um ambiente com ausência de P4, o aumento da concentração plasmática de estradiol tem efeito direto sobre o aumento da frequência de GnRH (CLARKE; CUMMINS, 1984) e, consequentemente, de LH. Esse estímulo hormonal é necessário para o crescimento final do FD. O pico pré-ovulatório de LH consiste em um pulso de alta frequência de liberação de LH (RAWLINGS; COOK, 1993) e, aproximadamente, 24 horas após este pulso ocorre a ovulação (para revisão SCARAMUZZI, et al., 1993). Quando há níveis altos de P4 associados à presença de estradiol, esta inibe a liberação GnRH. Consequentemente, os níveis plasmáticos de LH são inversos aos níveis de P4 (PANT; HOPKINSON; FITZPATRICK, 1977). A P4 sozinha não influencia a secreção de LH ou FSH, pois não tem efeito hipofisiário direto (CLARKE; CUMMINS, 1984).

### **1.1.2 Fotoperíodo: Controle do ciclo reprodutivo**

O fotoperíodo é o principal fator ambiental responsável por modular a duração da época reprodutiva nos ovinos criados em médias e altas latitudes (entre os paralelos 30 e 40°; ORTAVANT et al., 1988). Atua principalmente sobre as fêmeas e ocasiona variações no comportamento sexual e na atividade hipotálamo-hipófise-gonadal. Nos machos, age de forma menos intensa sobre os aspectos reprodutivos, como a espermatogênese (ROSA; BRYANT, 2003) e a síntese de testosterona (SCHANBACHER; LUNSTRA, 1976).

A luminosidade solar é captada pela retina e transmitida via neural pelo núcleo supraquiasmático e gânglios cervicais superiores para a glândula pineal, responsável pela secreção rítmica do hormônio melatonina (COMBARNOUS; SALESSE; GARNIER, 1981). A melatonina é secretada durante a noite, e a duração da sua secreção difere entre dias longos e curtos, sendo as suas flutuações séricas o mecanismo chave por regular as respostas reprodutivas ovarianas. (COMBARNOUS; SALESSE; GARNIER, 1981). Ela atua sobre o hipotálamo e regula a frequência de pulsos de GnRH, sendo amplificada durante os dias de menor duração, na espécie ovina. Consequentemente, ocorre o aumento da frequência de pulsos de LH, o que culmina no estímulo necessário para a ovulação (UILENBROEK; RICHARDS, 1979; VIGUIE et al., 1995). Já, durante os dias de maior duração, há a diminuição da liberação do hormônio liberador de GnRH e, assim, modula a secreção pulsátil de LH. Além disso, o

sistema de geração de pulsos de LH se torna mais sensível à ação negativa dos esteroides ovarianos, ocasionando a diminuição da sua frequência (VIGUIE et al., 1995; ROSA; BRYANT, 2003).

A época destinada à reprodução tem seu início no final do verão, em resposta à diminuição da luminosidade, e seu término durante os meados do inverno, devido ao respectivo aumento da luminosidade (ABECIA et al., 2012). Durante a contraestação reprodutiva, ocorre a parada da atividade sexual, caracterizada pelo comportamento de anestro (CHEMINEAU et al., 1992). Este comportamento sexual sazonal faz com que os ovinos sejam classificados como animais fotoperíodo negativo. Este mecanismo fisiológico restringe as parições durante a melhor época do ano (primavera/verão), dando suporte à produção lactogênica da fêmea e, consequentemente, promove o máximo crescimento e desenvolvimento de sua prole.

### **1.1.3     Dinâmica folicular ovariana**

O crescimento folicular ovariano ocorre em padrão de ondas que se mantém durante a época de reprodução e também durante o anestro sazonal (NOEL; BISTER; PAQUAY, 1993). Uma onda folicular é caracterizada pelo aparecimento e crescimento de um ou até três folículos dominantes de um montante de pequenos folículos (dois a três milímetros de diâmetro). É possível que um folículo cresça até cinco mm de diâmetro antes da sua regressão (onda anovulatória) ou ovulação (GINTHER; KOT; WILTBANK, 1995; BARTLEWSKI et al., 1998; GIBBONS et al., 1999; EVANS et al., 2000).

Didaticamente, os folículos antrais têm seu crescimento e desenvolvimento classificado em fases: recrutamento, seleção e dominância folicular (DRIANCOURT, 2001). O recrutamento folicular tem seu início após o término do crescimento folicular e durante esta fase os folículos são essencialmente dependentes do hormônio folículo estimulante (FSH; DRIANCOURT, 2001). Somente folículos com diâmetro superior a dois mm podem ser recrutados (DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985). A fase de seleção se caracteriza pela escolha de um ou mais folículos dominantes através da diminuição dos níveis circulantes de FSH, e por consequência atresia dos demais folículos dependentes dessa gonadotrofina (DRIANCOURT; GIBSON; CAHILL, 1985). A diminuição da secreção de FSH está relacionada ao aumento da concentração plasmática de estradiol e maior frequência de pulsos de LH. Baird; Swanston; Scaramuzzi (1976) mensuraram níveis plasmáticos de LH e estradiol nos dias 12, 14 e

16 do ciclo estral. Após cinco minutos de um pulso de LH a secreção de estradiol aumentou seu nível basal ( $0,75 \pm 0,12$  ng/min) e atingiu o valor de  $2,16 \pm 0,33$  ng/min. Ou seja, o folículo respondeu prontamente a flutuação de LH e mais estradiol foi secretado. Como mecanismo chave da seleção e dominância folicular, os folículos adquirem a capacidade de aceitar à alteração do aporte gonadotrófico, visto que somente os futuros folículos ovulatórios transferem a sua dependência hormonal do FSH para LH (CAMPBELL et al., 1999).

Em média, três ondas emergem durante o crescimento e desenvolvimento folicular ovariano, sendo que cada onda surge, aproximadamente, a cada cinco dias (BARTLEWSKI et al., 1998). Noel; Bister; Paquay (1993) observaram três ondas ovarianas tanto na época reprodutiva (início, meio e fim da estação), como no período de anestro. Os mesmos autores demonstraram que as duas primeiras ondas ocorrem durante a fase lútea (período de alta concentração de progesterona), e a última durante a fase folicular (período caracterizado pela regressão do corpo lúteo e diminuição da progesterona). Picos de FSH são liberados periodicamente a cada três ou quatro dias (GIBBONS et al., 1999), e cada aumento transitório desencadeia o aparecimento de uma nova onda folicular (BARTLEWSKI et al., 1998). Ginther; Kot; Wiltbank (1995) demonstraram, após monitoramento ovariano e dosagem hormonal, a equivalência de intervalo de dias entre as ondas foliculares ( $4,0 \pm 0,3$  dias) e entre picos FSH ( $3,6 \pm 0,2$  dias). Dentro de uma onda folicular ocorre a dominância, e o(s) folículo(s) dominante(s) apresenta(m) um maior diâmetro e também uma maior concentração de estradiol no fluido folicular (EVANS et al., 2000). Todos os folículos que crescem durante a fase lútea acabam se tornando atrésicos. No entanto, um ou dois folículos da fase folicular conseguem ovular (NOEL; BISTER; PAQUAY, 1993). Isso acontece porque durante a fase lútea há elevada concentração plasmática de progesterona (P4) e baixa pulsatilidade do LH. Consequentemente, este ambiente hormonal induz a redução da taxa de crescimento folicular e sua atresia.

Na maioria das raças ovinas, apenas um ou dois folículos ovulam no final de cada ciclo estral (NOEL; BISTER; PAQUAY, 1993). Entretanto, existem variações na taxa de ovulação entre animais, raças e, principalmente, pelo uso de gonadotrofinas, como a gonadotrofina coriônica equina (eCG). Driancourt; Webb; Fry (1991) constaram que o uso de 500 UI de eCG, durante a fase folicular do ciclo estral, induziu um aumento da taxa ovulatória. Este resultado indica que a dominância folicular ovariana em ovinos é intensamente passiva e pode ser manipulada pelo homem.

Durante o anestro sazonal os folículos são ativos, sintetizam e secretam estrógeno (SOUZA; CAMPBELL; BAIRD, 1996). Isso ocorre porque a frequência de liberação de FSH, que não é alterada na contraestação, estimula o crescimento de ondas foliculares (BARTLEWSKI et al., 1998). Contudo, o folículo ovariano dominante não consegue ovular devido a menor ocorrência de pulsos de LH (zero a dois pulsos a cada oito horas; I'ANSON; LEGAN, 1988). Como a frequência de secreção do LH é suprimida durante este período, é aceitável que somente o FSH estimule os folículos antrais a se desenvolverem até ao tamanho pré-ovulatório. Entretanto, a presença do LH é necessária para garantir a fase final do crescimento folicular, maturação e ovulação (UILENBROEK; RICHARDS, 1979).

## 1.2 MECANISMO DA OVULAÇÃO

Durante a ovulação ocorre a reativação da meiose oocitária, ruptura da parede apical do folículo, liberação do oócito e início da diferenciação tecidual que culminará na formação do corpo lúteo (RUSSELL; ROBKER, 2007). No decorrer do crescimento e desenvolvimento folicular, os receptores de LH são expressos na superfície folicular. A seleção do folículo dominante está correlacionada à expressão desses receptores nas células murais da granulosa (WEBB et al., 2003). O aumento da frequência de pulsos de LH provoca a formação da matriz extracelular no complexo cumulus-oócito (SILVA et al., 2006). Esse processo denominado como expansão do cumulus envolve a síntese do ácido hialurônico, de proteínas de superfície celular e proteoglicanos (RUSSELL; SALUSTRI, 2006). Ele permite a extrusão do oócito por meio da parede folicular durante a ovulação, e ajuda na sua captura pelas fimbrias do oviduto. Além disso, essa matriz extracelular contribuir com fecundação do oócito, pois auxilia na estabilização da zona pelúcida e ativação da motilidade espermática.

A ovulação inicia após o pico pré-ovulatório de LH e é dependente de proteases, colagenases e fatores vasoativos (prostaglandinas e leucotrienos; ESPEY, 1980). Essa gonadotrofina se liga ao receptor de membrana (acoplado à proteína G) nas células da granulosa e provoca a ativação da adenilatociclase (AC) e o aumento da adenosina cíclica monofosfato (AMPc; RUSSELL; SALUSTRI, 2006). O AMPc, através da proteína quinase dependente de AMPc, estimula três eventos distintos da ovulação: esteroidogênese, ciclooxygenase e lipoxigenase (aumento da síntese de prostaglandina e leucotrieno) e ativador do plasminogênio (acelera a transformação do plasminogênio em plasmina; MORIOKA et al., 1988). O pico pré-ovulatório de LH induz também o

aumento na colagenase latente, a luteinização de células granulosas/tecais e a modificação na via esteroidogênica (NISWENDER et. al., 2000). A luteinização causa a diminuição da atividade da aromatase e como resultado há diminuição da produção estrogênica (PETROFF et al., 2001). Ocorre então o aumento das enzimas necessárias para a conversão de colesterol em progesterona, isto é, aumento da expressão do complexo citocromo P450 de clivagem de cadeia lateral de colesterol (CYP11A1) e da 3 $\beta$ -hidroxi-esteroide-desidrogenase (3 $\beta$ -HSD; BAO; GARVERICK, 1998). Com isso, ocorre a redução da expressão das enzimas que convertem a progesterona em estrógenos, isto é, as enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilase (CYP17) e aromatase (CYP19; BAO; GARVERICK, 1998).

A ação dos mediadores do processo inflamatório e fatores angiogênicos em diferentes tecidos colaboraram para o entendimento da sua importância durante o processo ovulatório. O pico de LH aumenta a síntese de prostaglandinas (PGF) foliculares antes mesmo da ovulação. A enzima ciclooxigenase (COX-2) é a responsável pela biossíntese das prostaglandinas (SIROIS et al., 2004). Essa síntese ocorre através da ativação da fosfolipase C que degrada fosfolipídeos de membrana e permite a liberação de cálcio. Essa enzima provoca a fosforilação da fosfolipase A2 que quebra fosfolipídeos de membrana, e por consequência, há a liberação do ácido araquidônico que será convertido em PGF pela COX 2. A prostaglandina F2 $\alpha$  atua na contração da musculatura lisa do ovário, e por consequência no aumento da pressão local e protrusão do estigma ovariano. Esse metabólito do ácido araquidônico atua também na ruptura dos lisossomos das células da granulosa. As enzimas liberadas agem na degradação do tecido conectivo da região do estigma. A PGE2 $\alpha$  auxilia na remodelação das células da teca e da granulosa em células lúteas, pois ativa o plasminogênio que é convertido em plasmina (para revisão, TSAFRIRI, et al. 1972). A plasmina e a colagenase ativada causam a degradação do colágeno da parede do folículo. Esses processos de digestão e dissociação das fibras de colágeno causam a abertura da parede folicular com a formação e ruptura do estigma folicular (MORIOKA et al., 1988).

### **1.3 HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA (GNRH)**

#### **1.3.1 Decapeptídeo hipotalâmico**

GnRH ou GnRH I, antigamente denominado como hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH); (FERNALD; WHITE, 1999) é um decapeptídeo hipotalâmico (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) que desempenha função essencial no controle reprodutivo em todos os seres vertebrados (MCARDLE; PERRETT, 2013). O mesmo é sintetizado no corpo celular dos neurônios hipotalâmicos, e seus axônios terminais se projetam na eminência mediana na base do hipotálamo onde é liberado de forma pulsátil, diretamente, no sistema portal hipofisário das células gonadotróficas na hipófise anterior (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002; CONN; CROWLEY, 1994). Este decapeptídeo se liga a receptores hipofisários e provoca uma sequência de eventos que incluem a microagregação desses receptores, internalização e ativação das vias de transdução de sinais de segundo mensageiro, como resultado há síntese e liberação de LH e FSH (BLISS, et al., 2010). Esses dois hormônios são glicoproteínas heterodímeras formadas com uma subunidade  $\alpha$  comum e uma subunidade  $\beta$  distinta (CONN; CROWLEY, 1994). Após a síntese dessas gonadotrofinas no retículo endoplasmático rugoso e passagem pelo complexo de Golgi, as mesmas se fundem à membrana plasmática e lá permanecem até serem liberadas (DURÁN-PASTÉN; FIORDELISIO, 2010). O LH é liberado em resposta a pulsos de GnRH e age na maturação final e indução da ovulação. Já o FSH não fica estocado e é liberado de forma contínua, o mesmo estimula o crescimento dos folículos ovarianos.

A primeira identificação e isolamento do GnRH foi feita na década de 1970 por Andrew V. Schally. O mesmo isolou a molécula de GnRH a partir de extratos hipotalâmicos de suínos (para revisão KARTEN; RIVIER, 1986). Posteriormente, elucidou-se que a sua sequência decapeptídica foi conservada em todos os mamíferos (para revisão PADULA, 2005). Entretanto, este neuropeptídio é rapidamente degradado, pois apresenta uma meia-vida de apenas 2 a 4 minutos (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002). Assim, iniciou-se o desenvolvimento e produção de análogos agonistas com elevada afinidade aos receptores da GnRH e com maior resistência à degradação e eliminação (KARTEN; RIVIER, 1986; BERGER, et al., 1988). Desde então, as pesquisas resultaram no desenvolvimento de mais de 2000 diferentes análogos

de GnRH, nos últimos 30 anos, tanto análogos de origem agonista como antagonista (para revisão PADULA, 2005).

### **1.3.2 Mecanismos de ação do GnRH**

O GnRH é o neurohormônio responsável pela liberação de LH e FSH, bem como pela biossíntese das suas subunidades  $\alpha$ , LH $\beta$  e FSH $\beta$ . Sua ação ocorre através dos receptores de GnRH (GnRH-R) que estão presentes na superfície das células gonadotróficas da hipófise anterior e representam 8 a 15% das células (para revisão RUF; FINK; SEALFON, 2003). O número de GnRH-R é superior no momento que antecede a ovulação, e possivelmente determina a completa expressão do pico pré-ovulatório de LH (RISPOLI; NETT, 2005). É fundamental o entendimento dos mecanismos que regulam a densidade de receptores, pois variações na sensibilidade pituitária interferem na resposta ao GnRH e na liberação do LH (RISPOLI; NETT, 2005).

O GnRH-R pertence à família dos receptores acoplados à proteína G do tipo rodopsina (GPCR; KARGES; KARGES; DE ROUX, 2003). Sua estrutura é formada por um domínio extracelular amino-terminal, sete domínios transmembranosos, três alças extracelulares, três alças intracelulares, e por um domínio intracelular carboxi-terminal (HAUACHE, 2001). Os mesmos são ativados pelo GnRH endógeno, mas também pela ação dos seus análogos agonistas (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002). Na molécula do GnRH, as sequências NH2- (pGlu-His-Trp-Ser) e COOH-terminal (Pro-Gly NH2) são cruciais para a ligação ao receptor e sua ativação (MILLAR, 2005). Quando ligado, sua estrutura é dobrada em torno da glicina flexível da posição seis (MILLAR, 2005).

Durante a ativação dos GnRH-R, a subunidade alfa da proteína Gq /11 se dissocia e ativa a fosfolipase C (PLC- $\beta$ ; GARDNER, 2010). Ocorre então a momentânea hidrólise de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) e a formação de dois segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3; GARDNER, 2010). O IP3 desencadeia a mobilização de cálcio a partir de pools intracelulares (retículo endoplasmático), e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC; ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002). Posteriormente, ocorre a redução do afluxo de cálcio mediado pela despolarização e em sinergismo a secreção de gonadotrofinas (DURÁN-PASTÉN; FIORDELISIO, 2013). A PKC ativada implica na ativação da via proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK), como ERKs, p38MAPK e JNK (RUF;

FINK; SEALFON, 2003; GARDNER, 2010). A MAPK ativa fatores de transcrição por meio da fosfolipase A2 (PLA2), que resulta na modulação da transcrição gênica das subunidades gonadotróficas, biossíntese e libertação de LH e FSH (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002; KARGES; KARGES; DE ROUX, 2003).

A atividade central do GnRH pode ser modulada por sinais estimulatórios (kisspeptina, norepinefrina e neuropeptídeo Y), ou inibitórios ( $\beta$ -endorfina e interleucina-1), mas também por agentes que podem ser estimulatórios ou inibitórios, como os esteroides (TSUTSUMI; WEBSTER, 2009). A pulsatilidade do GnRH é essencial para a conservação da função ovariana através da manutenção da sua ciclicidade. Sabe-se que os pulsos de alta frequência beneficiam a liberação de LH, enquanto os pulsos de baixa frequência favorecem a liberação de FSH (SCHNEIDER; TOMEK; GRÜNDKER, 2006). Kaiser et al. (1997) demonstraram que os níveis de RNAm da subunidade LH $\beta$  são estimulados por pulsos a cada 30 minutos, enquanto os níveis de RNAm da subunidade FSH $\beta$  por pulsos a cada 2 horas. A subunidade  $\alpha$  é estimulada por pulsos a cada 8 a 30 minutos, ou até em menores frequências (FERRIS; SHUPNIK, 2006). A liberação assíncrona das gonadotrofinas resulta do efeito modulador de esteroides sexuais, hormônios peptídicos e glicoprotéicos.

### **1.3.3 Agonistas de GnRH**

Conforme a origem, o GnRH comercial pode pertencer a dois grupos distintos: o GnRH sintético semelhante ao natural (Gonadorelina) ou a forma de análogo agonista (ZAPLETAL; PAVLIK, 2008). Os análogos agonistas são moléculas semelhantes ao endógeno, porém com pontuais modificações nos sítios de degradação enzimática. O aumento da resistência às peptidases, e a maior afinidade da molécula ao seu receptor, prolongaram a meia-vida na circulação destes agonistas (HERBERT; TRIGG, 2005). Esses análogos são denominados de superanalógos, e alguns chegam a ser até 20 vezes mais potentes que o endógeno (ZAPLETAL; PAVLIK, 2008). Isso acontece através da estabilização da molécula de GnRH contra os ataques enzimáticos, e assim o aumento do período de união às proteínas circulantes e a membranas (CONN; CROWLEY, 1994).

Estes peptídeos sintéticos têm sua estrutura química proveniente da substituição de aminoácidos específicos na posição 6 ou nas posições 6 e 10 (ROMAGNOLI et al., 2009). A modificação na posição 6 resultou no acréscimo da meia-vida na corrente sanguínea, pois esta é a posição em que as peptidases quebram a molécula de GnRH

(para revisão PADULA, 2005). Além disso, a substituição da glicina por um d-aminoácido (isômeros dextrógiros) estabilizou a conformação em dobradiça da molécula ligada ao receptor, mas também aumentou a afinidade da ligação e diminuiu a depuração metabólica (KIESEL, 2002). Na décima posição, a substituição da glicina carboxi-terminal por alquilaminas, resultou em análogos nonapeptídicos com maior potência de indução a ovulação (PADULA, 2005). A ocupação de somente 5% dos sítios de ligação dos GnRH-R já permite 80% da sua expressão biológica (KIESEL, 2002).

Inicialmente, as formas sintéticas de GnRH foram produzidas com o intuito de curar a infertilidade na medicina humana. Entretanto, foi visto que a sua administração contínua causa o bloqueio do eixo hipotálamo-hipofisiário. Esse efeito colateral resulta da saturação dos receptores de GnRH e desregulação da sinalização intracelular. Ou seja, a administração contínua de GnRH provoca o *downregulation* da subunidade Gq/11 (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002). Em resposta à modificação na densidade de GnRH-R disponíveis e à própria sensibilidade do gonadotrofo ao GnRH, ocorre a supressão da produção e liberação dos hormônios gonadotróficos (MEDEIROS; MEDEIROS, 2007).

### **1.3.4 Diferentes GnRH utilizados na reprodução animal**

O GnRH é utilizado com o intuito de sincronizar o pico de LH e, assim, a ovulação (PIERSON et. al., 2003). Em programas reprodutivos, pode ser empregado na sincronização da ovulação em protocolos de inseminação em tempo fixo (IATF) (FRICKE; GUENTHER; WILTBANK, 1998). Também como forma de tratamento de cistos foliculares ovarianos (MEDAN et al., 2004), indução de estro (WALTER et. al., 2011), e até mesmo com o intuito de inibir a ciclicidade (ROMAGNOLI et. al., 2009).

No mercado veterinário há diversas formas sintéticas de análogos de GnRH e também a forma semelhante ao endógeno (PICARD-HAGEN et al., 2015). Essas moléculas são distinguidas de acordo com a sua ação. A forma sintética de curta ação é denominada gonadorelina, e os análogos sintéticos de curta ação são a buserelina e a lecirelina (ROMAGNOLI et al, 2009). Há três décadas essas formas se encontram disponíveis para uso (ROMAGNOLI et al, 2009). O análogo sintético de longa ação é a deslorelin, na forma de implante subcutâneo, e está disponível há 15 anos na área médica, e mais recentemente na área animal (ROMAGNOLI et al., 2009). As moléculas aprovadas para uso em bovinos, tanto na América do Norte como na Europa, são: um

decapeptídeo (gonadorelina) e dois nonapeptídeos (lecirelina e buserelina; PICARD-HAGEN et al., 2015). Já a deslorelinha se encontra comercialmente disponível para uso em equinos (STICT et. al., 2004) e caninos (FONTAINE et al., 2011).

Há diferenças na estrutura molecular das formas sintéticas de GnRH. A lecirelina é um nonapeptídeo em que a glicina da posição 6 foi substituída por um d-terciária leucina e a glicina da posição 10 foi alterada por uma etilamida (KAYA et al., 2007). A gonadorelina é a forma sintética equivalente ao GnRH-1 e, assim como o endógeno, é formada por uma cadeia de 10 aminoácidos (CHENAULTL et al., 1990). A buserelina tem uma d-serina na posição seis e uma etilamida na posição 10 (PICARD-HAGEN et al., 2015). A deslorelinha é produzida a partir da troca da glicina na posição 6 pelo triptofano, e pela substituição da glicina na posição 10 por uma etilamida (KIESEL et al., 2002). Em bovinos, foi demonstrado que o pico de LH ocorre duas horas após a administração intramuscular de buserelina e lecirelina. O mesmo ocorreu uma hora mais cedo quando aplicada a gonadorelina (PICARD-HAGEN et al., 2015). No entanto, Giordano et al. (2012) demonstraram que o horário do pico de LH pode variar, sendo 1,3 ou até 1,9 horas após a aplicação da gonadorelina. Esses peptídeos, com exceção da deslorelinha, são corriqueiramente associados a outros hormônios, como progestágenos, gonadotrofinas e prostaglandina, em protocolos reprodutivos na espécie ovina. Entretanto, são utilizados de forma empírica, pois não há no mercado veterinário fórmulas licenciadas e indicação de dose e concentração para uso em ovinos. Todavia, inúmeros trabalhos são realizados com o intuito de avaliar o efeito do GnRH sobre parâmetros reprodutivos, como na sincronização da ovulação (BALARO et al., 2016), sincronização do estro (REKIK et al., 2016), resposta superovulatória (BRASIL et al., 2016), concentração de progesterona (HASHEM et al., 2015), recuperação embrionária (AZAWI; AL-MOLA, 2011), taxa de ovulação (CAVALCANTI et al., 2012) e taxa de prenhez (HASHEM et al., 2015).

**2 CAPÍTULO****MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual será submetido:

## 2.1 MANUSCRITO

**Efficiency of different synthetic forms of GnRH to induce LH release in sheep.**

R. G. Pereira, C. A. Hoefle, A. Fritzen, G. Fiordalisi, R. Ferreira

De acordo com normas para publicação em:

**Theriogenology**

1   **Efficiency of different synthetic forms of GnRH to induce LH release in sheep.**

2   Raquel Grande Pereira<sup>a</sup>, Clério Antonio Hoefle<sup>a</sup>, Alexandre Fritzen<sup>a</sup>, Giovanna Fiordalisi<sup>a</sup>,  
3   Rogério Ferreira<sup>a\*</sup>

5   <sup>a</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

6   \* Corresponding author. Tel.: +55(49) 2049-9556; Fax: +55(49) 2049-

7   9553. E-mail address: [rogerio.ferreira@udesc.br](mailto:rogerio.ferreira@udesc.br).

10   **ABSTRACT**

12   To date, there have been no studies testing the capacity of gonadotropin releasing hormone  
13   (GnRH) analogs and respective doses to induce a luteinizing hormone (LH) peak in sheep. In  
14   this sense, the present study aimed to evaluate the capacity of different synthetic forms and  
15   doses of GnRH in inducing LH release in sheep. Forty ewes were allocated into eight groups,  
16   according to which synthetic form of GnRH and concentration was assayed: lecirelin (12.5 or  
17   25 µg), gonadorelin (50 or 100 µg), buserelin (4.2 or 8.4 µg), or deslorelin (375 or 750 µg).  
18   All ewes received an intravaginal device of medroxyprogesterone acetate for 7 days. A dose  
19   of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) was administered on day 5 and the GnRH was administered on  
20   day 7. For determination of LH concentration, blood samples were obtained just before the  
21   administration of GnRH as well as 2, 4, and 6 h after the administration. The full-dose of  
22   gonadorelin (100 µg) and buserelin (8.4 µg) induced a higher LH peak compared to half-  
23   doses (50 and 4.2 µg respectively for gonadorelin and buserelin;  $P < 0.05$ ), two hours after  
24   administration of GnRH. However, for the other agonist, the amplitude of LH peak was not  
25   affected by the tested dose ( $P > 0.05$ ). The total release of LH (area under the curve – AUC)  
26   after treatment with 50 µg of gonadorelin ( $31.7 \pm 5.9$  ng h/mL) was significantly lower ( $P <$   
27   0.05) than after other treatments. However, this result was similar ( $P > 0.05$ ) to the 100 µg of  
28   gonadorelin assayed. In conclusion, the present experiment shows that buserelin (8.4 µg),  
29   lecirelin (12.5 and 25 µg) and deslorelin (375 and 750 µg) induced a greater stimulatory  
30   effect on LH secretion than gonadorelin treatment. Therefore, we believe that GnRH  
31   analogues are possibly more efficient than gonadorelin in inducing ovulation in sheep. In  
32   light of the obtained results, we recommend the use of 12.5 µg lecirelin, 375 µg deslorelin or  
33   8.4 µg buserelin for inducing a higher LH release.

35   **KEYWORDS**

36   Gonadorelin, lecirelin, buserelin, deslorelin, ewe

37

38 **1 INTRODUCTION**

39

40 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a decapeptide produced by hypothalamic  
41 neurons that stimulates the synthesis and release of follicle-stimulating hormone (FSH) and  
42 luteinizing hormone (LH) from the anterior pituitary. In reproductive programs, GnRH is  
43 commonly used to improve synchrony of the LH surge and consequent ovulation [1].  
44 However, GnRH has a short half-life on the systemic circulation (approximately 2–4  
45 minutes) and is rapidly degraded [2]. There are natural-like agonists for GnRH  
46 (gonadorelin) and synthetic analogs that are more potent and have a longer half-life than  
47 native GnRH. In general, analogs sequences have a d-amino acid in the 6<sup>th</sup> position that  
48 confers greater stability against degradation [3,4]. Similarly, substitution of the carboxy-  
49 terminal glycine by non-peptide alkyl amines has produced nonapeptides with greater  
50 potency [5,6]. Gonadorelin is like natural GnRH, whereas buserelin, deslorelin and lecirelin  
51 are nonapeptides. Lecirelin differs from the natural GnRH by a substitution of glycine by a d-  
52 tertiary leucine at the 6<sup>th</sup> position, and glycine by an ethylamide at the 10<sup>th</sup> position [7],  
53 while buserelin is characterized by a d-serine in the 6<sup>th</sup> position and ethylamide in the 10<sup>th</sup>  
54 position [7]. Finally, deslorelin has a tryptophan in the 6<sup>th</sup> position and an ethylamide in the  
55 10<sup>th</sup> position [4].

56 In the veterinary market, synthetic forms of GnRH analogs and also similar natural forms  
57 are available. Studies in bovines reported different LH release after using distinctive doses  
58 or agonist of GnRH [8–10]. However, in sheep no studies have attested the capacity of the  
59 forms of GnRH and their doses to induce an LH peak.

60 These peptides, with the exception of deslorelin, are commonly associated with other  
61 hormones in reproductive protocols in sheep. Thus, these hormones are used empirically;  
62 there are no licensed formulas or dose/concentration indications for use in sheep. However,  
63 numerous studies have been published evaluating the effect of GnRH in reproductive  
64 parameters, such as synchronization of ovulation [11], estrus synchronization [12],  
65 superovulatory response [13], and pregnancy rate [14]. Nevertheless, in the reported  
66 studies, GnRH was used in conjunction with eCG (equine chorionic gonadotropin, which  
67 has an LH effect in sheep) and/or low progesterone, so that the isolated effect of GnRH  
68 could not be tested. Therefore, the aim of this study was to evaluate the capacity of  
69 different doses and synthetic forms of GnRH in being able to induce LH release in sheep.  
70

71 **2 MATERIALS AND METHODS**

72

73 **2.1 Animals and management**

74

75 This study was performed in Southern Brazil ( $27^{\circ}02'11''S$   $52^{\circ}39'24.6''W$ ) in forty  
76 nulliparous Laucane breed ewes kept in confined conditions. The animals were aged 8 to 10  
77 months old and weighed 45 to 50 kg. The trial was performed during early April,  
78 corresponding to the breeding season in this region.

79

80 **2.2 Experimental treatment**

81

82 All procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Use of the University of  
83 Santa Catarina State (CEUA/UDESC). The animals were randomly divided into eight  
84 treatment groups ( $n = 5$ ), each group being administered a particular synthetic form of  
85 GnRH tested and at a specific dose. On Day 0, all ewes received an intravaginal device of  
86 medroxyprogesterone acetate (MAP; 60 mg, Progespon®, Zoetis) that remained for 7 days.  
87 The implants were maintained until the last blood sample collection to avoid endogenous  
88 release of GnRH. A PGF<sub>2α</sub> analogue (0.125 mg cloprostenol, Estron®; Tecnopec) was  
89 administered intramuscularly on Day 5 and the GnRH analog was administered (im) on  
90 Day 7 (Table 1).

91

92 **2.3 Blood sampling**

93

94 Blood samples were collected from the jugular vein using sterile vacuum-assisted blood  
95 collection tubes for determination of LH concentration. The blood samples were obtained  
96 just before the GnRH administration and at 2, 4, and 6 h after the GnRH administration.  
97 After collection, the samples were chilled in ice and desorbed. Then the serum samples  
98 were stored at -20 °C until assayed.

99

100 **2.4 Hormone assay**

101

102 Serum concentrations of LH were determined in duplicate by radioimmunoassay (RIA),  
103 according to the method adapted from Bolt et al [15] for bovines. Intra- and inter-assay  
104 coefficients of variation were 5.96% and 6.98%, respectively. The sensitivity of the assay  
105 was 0.77 ng/ml.

106

107 **2.5 Statistical analysis**

108

109 The total release of LH in response to the GnRH agonist was assessed calculating the area  
110 under the curve ( $AUC_{LH}$ ) by trapezoidal method from the moment of GnRH administration  
111 until 6 h later. The effect of experimental groups on  $AUC_{LH}$  was assessed by two-way  
112 ANOVA. To identify significant differences between groups, the LSMeans Student's t  
113 post-hoc test was used for pairwise multiple comparisons. LH serum concentration was  
114 compared between the two doses of each GnRH agonist using PROC MIXED (mixed  
115 models, SAS Institute Inc., Cary, NC) in a model for repeated data. The main effects of  
116 GnRH dose, time, and their interactions were determined. The effect of the dose at a  
117 specific time point was determined by Student's t test using corrected means (LSmeans).  
118 The different covariance structures were tested for each model and the composite symmetry  
119 was used, since it presented the lowest Akaike information criterion (AIC). All continuous  
120 variables, as well as residuals from each model, were tested for normality using the Shapiro-  
121 Wilk test and normalized, when necessary, according to each distribution. All analyses were  
122 performed with the statistical package SAS and were adopted as level of significance  $P <$   
123 0.05.

124

125 **3 RESULTS**

126

127 The maximal LH concentration induced by gonadorelin at doses of 50 µg and 100 µg (12.0  
128  $\pm$  2.4 ng/mL and 28.6  $\pm$  7.1 ng/mL, respectively) was lower ( $P < 0.05$ ) than serum LH  
129 induced by 8.4 µg of buserelin (78.9  $\pm$  12.9 ng/mL), 375 µg and 750 µg of deslorelin (75.6  $\pm$   
130 7.4 ng/mL and 72.1  $\pm$  10.6 ng/mL, respectively) and 12.5 µg and 25 µg of lecirelin (73.3  $\pm$   
131 17.8 ng/mL and 61.6  $\pm$  5.9 ng/mL, respectively). However, the maximal LH concentration  
132 induced by 4.2 µg of buserelin (49.4  $\pm$  5.9 ng/mL) was similar ( $P > 0.05$ ) to the 100 µg of  
133 gonadorelin assayed.

134 The serum LH concentrations for each period assayed after GnRH agonist intramuscular  
135 administration are shown in Figure 1. The LH peak was clearly identified at 2 h post-GnRH  
136 administration, and, after a delay of 6 h the serum concentrations returned to near control  
137 levels for all eight GnRH treatments. The larger doses of gonadorelin (100 µg) and  
138 buserelin (8.4 µg) induced a significantly higher LH peak at 2 h after administration  
139 compared to the smaller doses (50 and 4.2 µg respectively for gonadorelin and buserelin;  $P$

140 < 0.05). However, for the other agonists assayed, the amplitude of LH peak was not affected  
141 in a dose-manner ( $P > 0.05$ ).

142 The AUC<sub>LH</sub> is shown in Figure 2. With 50 µg of gonadorelin, the AUC<sub>LH</sub> was lower (31.7 ±  
143 5.9 ng h/mL;  $P < 0.05$ ) than the values obtained after GnRH analogous treatment (buserelin,  
144 lecirelin, and deslorelin). However, it was similar ( $P > 0.05$ ) to the 100 µg of gonadorelin  
145 assayed (68.1 ± 15.5 ng h/mL).

146

#### 147 4 DISCUSSION

148

149 This study was done in order to determine the effectiveness of different doses and synthetic  
150 forms of GnRH in sheep. Assuming that the therapeutic effect of GnRH is directly related to  
151 the LH release, it is clearly evident that synthetic analogs (buserelin, deslorelin, and lecirelin)  
152 had a greater efficacy to induce LH release than gonadorelin. In addition, we demonstrated  
153 that the tested doses of deslorelin, an analog indicated to induce ovulation in the equine [16]  
154 had a response similar to other nonapeptides that already are utilized in sheep.

155 The LH release (AUC) after 50 µg of gonadorelin was lower than after analog treatments  
156 (buserelin, deslorelin, and lecirelin). These results are consistent with observations in  
157 bovines, since the nonapeptide analogs had prolonged action compared to gonadorelin [8].  
158 Thus, GnRH agonist analogs are peptides similar to native GnRH, but with modifications at  
159 sites of enzymatic degradation, so they are, therefore, more resistant to peptidases. In  
160 addition, GnRH agonists have greater receptor-binding affinity and a longer half-life  
161 [5,6,17].

162 In the present study, GnRH analogs (buserelin, deslorelin, and lecirelin) induced a maximal  
163 LH concentration greater than that described in other studies as a preovulatory LH surge  
164 peak in sheep [18,19]. We speculate that these agonists can be indicated as ovulation  
165 inducers for sheep, since they induced a sufficient LH peak to promote a possible ovulation.  
166 Gonadorelin was unable to induce an LH peak similar to the LH concentrations observed  
167 during the preovulatory period, at least at the periods selected in the study design. However,  
168 it should be considered that acquisition of ovulatory capacity is associated with follicle  
169 diameter. Thus, there is a gradual increase of mRNA expression to LH receptors (LHCGR)  
170 in granulosa cells according to the growth of the dominant follicle [20,21]. Sartori et al.  
171 [22] reported that high LH doses in cows are required to induce ovulation of smaller  
172 follicles while smaller plasma LH concentrations could be sufficient to induce ovulation of  
173 follicles larger than 12 mm. Gonadorelin induced a lower release of LH. Possibly only  
174 larger follicles would respond to gonadorelin. This can justify the successful reproductive

175 programs that used gonadorelin to induce ovulation [12,23]. In contrast, administering more  
176 potent GnRH analogs (buserelin, deslorelin, and lecirelin) could induce ovulation even of  
177 smaller follicles, once that GnRH analogs cause greater LH release from the anterior  
178 pituitary.

179 In our study, we observed that increasing the buserelin dose from 4.2 to 8.4 µg and  
180 gonadorelin from 50 to 100 µg determined a higher LH peak. Our data suggest that  
181 pituitary response to buserelin and gonadorelin is dose-dependent and that the maximum  
182 effective dose was not achieved by a half-dose. The increased GnRH dose could be a  
183 method to enhance pituitary LH release during reproductive protocols [24]. From a practice  
184 perspective, increasing the GnRH dose could be a simple method to enhance LH release,  
185 potentially resulting in an increased ovulation rate. However, there were no significant  
186 differences between the doses of deslorelin and lecirelin assayed. Thus, full-doses and half-  
187 doses were able to trigger a sufficient LH response to promote a possible ovulation. In  
188 agreement with our findings, studies in cattle demonstrated either an increase or  
189 maintenance of LH release in response to increasing doses of GnRH (gonadorelin, lecirelin,  
190 and buserelin) [7,9,25,26].

191 Irrespective of the analogs tested, we showed that the synthetic GnRH induced a rapid  
192 increase of LH concentrations (at 2 h after administration) and a further decline within 6 h.  
193 Picard-Hagen et al. [7] obtained a similar result in cattle, with a rapid increment of LH  
194 concentrations in response to GnRH agonists and a subsequent decrease within 6 h.  
195 Therefore, the period analyzed was enough to characterize the LH curve.

196 The magnitude of response to GnRH agonists appears to depend on the LH amount in the  
197 pituitary and the presence of active GnRH receptors. In our experimental design, the GnRH  
198 response was evaluated under standardized conditions, that is, in a hormonal environment  
199 where the endogenous GnRH secretion was blocked by progestogen via a controlled-release  
200 device. This is possible because the progesterone treatment concomitant with GnRH  
201 administration does not affect GnRH-induced LH release [27]. Thus, during this period, it  
202 was possible to replenish the cytoplasmic stock of LH granules, once it began 48 h after the  
203 last LH peak and was completed after 96 h [28]. In addition, all ewes received a  
204 prostaglandin analog 48 h before GnRH to ensure a similar concentration of progesterone,  
205 based only on the progesterone analog from the controlled-release device.

206 The interest in measuring the response to different GnRH doses was due to a dose-  
207 dependent response observed in sheep [29] and in other species like bovine [8,10], buffalo  
208 [30] and equine [31]. The doses tested herein were established based on hormonal protocols  
209 in sheep using lecirelin [11], buserelin [32,33] and gonadorelin [12,34]. The dose of 12.5

210 µg of lecirelin was established as half of the full-dose. As we did not find studies using  
211 injectable short-term deslorelin in sheep, the full-dose was based on the minimum effective  
212 dose used for equine [35].

213 In conclusion, the present experiment shows that buserelin (8.4 µg), lecirelin (12.5 and 25  
214 µg) and deslorelin (375 and 750 µg) induced a greater stimulatory effect on LH secretion  
215 than gonadorelin treatment. Therefore, the GnRH analogous agonist can be used during  
216 breeding season in reproductive protocols for sheep. Moreover, we speculate that the GnRH  
217 analogs are possibly more efficient than gonadorelin in inducing ovulation in sheep. Based  
218 on our data, we recommend the use of 12.5 µg of lecirelin, 375 µg of deslorelin or 8.4 µg of  
219 buserelin for higher LH release.

220

## 221 Acknowledgements

222

223 The authors would like to thank the C. Chapecó for providing the animals used in this  
224 work. We are also very grateful to Mrs. R. Viega for animal care and for all the assistance  
225 provided during the study. This work was supported by Conselho Nacional de  
226 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 477843/2013-1) and  
227 Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC; grant  
228 number 2015tr269). FAPESC supported R G Pereira with a scholarship.

229

## 230 5 REFERENCES

231

- 232 [1] Pierson JT, Baldassarre H, Keefer CL, Downey BR. Influence of GnRH administration  
233 on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. Theriogenology 2003;60:397–  
234 406. doi:10.1016/S0093-691X(03)00037-2.
- 235 [2] Ortmann O, Weiss JM, Diedrich K. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and  
236 GnRH agonists: mechanisms of action. Reprod Biomed Online 2002;5 Suppl 1:1–7.  
237 doi:10.1016/S1472-6483(11)60210-1.
- 238 [3] Schneider F, Tomek W, Gründker C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its  
239 natural analogues: A review. Theriogenology 2006;66:691–709.  
240 doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.025.
- 241 [4] Kiesel LA, Rody A, Greb RR, Szilagyi A. Clinical use of GnRH analogues. Clin  
242 Endocrinol (Oxf) 2002;156:677–87. doi:10.1046/j.1365-2265.2002.01291.x.
- 243 [5] Padula AM. GnRH analogues - Agonists and antagonists. Anim Reprod Sci  
244 2005;88:115–26. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.05.005.

- 245 [6] Romagnoli S, Stellella C, Milani C, Gelli D, Falomo ME, Mollo A. Clinical use of  
246 deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Domest Anim* 2009;44:36–  
247 9. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01441.x.
- 248 [7] Picard-Hagen N, Lhermie G, Florentin S, Merle D, Frein P, Gayrard V. Effect of  
249 gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle.  
250 *Theriogenology* 2015;84:177–83. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.03.004.
- 251 [8] Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC. LH and FSH response of  
252 Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology*  
253 1990;34:81–98. doi:10.1016/0093-691X(90)90579-I.
- 254 [9] Colazo MG, Ree TO, Emmanuel DG V, Ambrose DJ. Plasma luteinizing hormone  
255 concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin  
256 releasing hormone. *Theriogenology* 2009;71:984–92.  
257 doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.002.
- 258 [10] Souza AH, Cunha AP, Silva EPB, Gümen A, Ayres H, Guenther JN, et al. Comparison of  
259 gonadorelin products in lactating dairy cows: Efficacy based on induction of ovulation of  
260 an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology*  
261 2009;72:271–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.016.
- 262 [11] Balaro MFA, Fonseca JF, Barbosa TGB, Souza-Fabjan JMG, Figueira LM, Teixeira TA,  
263 et al. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the  
264 superovulatory Day 0 protocol. *Domest Anim Endocrinol* 2016;54:10–4.  
265 doi:10.1016/j.domaniend.2015.07.002.
- 266 [12] Rekik M, Haile A, Abebe A, Muluneh D, Goshme S, Ben Salem I, et al. GnRH and  
267 prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based  
268 treatments in sheep. *Reprod Domest Anim* 2016;51:924–9. doi:10.1111/rda.12761.
- 269 [13] Brasil OO, Moreira NH, Santos G, Silva BDM, Mariante AS, Ramos AF. Superovulatory  
270 and embryo yielding in sheep using increased exposure time to progesterone associated  
271 with a GnRH agonist. *Small Rumin Res* 2016;136:54–8.  
272 doi:10.1016/j.smallrumres.2016.01.005.
- 273 [14] Hashem NM, El-Zarkouny SZ, Taha TA, Abo-Elezz ZR. Oestrous response and  
274 characterization of the ovulatory wave following oestrous synchronization using PGF2α  
275 alone or combined with GnRH in ewes. *Small Rumin Res* 2015;129:84–7.  
276 doi:10.1016/j.smallrumres.2015.06.003.
- 277 [15] Bolt DJ, Scott V, Kiracofe GH. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-  
278 RH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim Reprod Sci* 1990;23:263–71.  
279 doi:10.1016/0378-4320(90)90040-M.

- 280 [16] Stich KL, Wendt KM, Blanchard TL, Brinsko SP. Effects of a new injectable short-term  
281 release deslorelin in foal-heat mares. *Theriogenology* 2004;62:831–6.  
282 doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.004.
- 283 [17] Herbert CA, Trigg TE. Applications of GnRH in the control and management of fertility  
284 in female animals. *Anim Reprod Sci* 2005;88:141–53.  
285 doi:10.1016/j.anireprosci.2005.05.007.
- 286 [18] Rawlings NC, Cook SJ. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin  
287 surge in the ewe. *Anim Reprod Sci* 1993;30:289–99. doi:10.1016/0378-4320(93)90079-  
288 7.
- 289 [19] Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian activity during sexual  
290 maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Rumin Res*  
291 2002;43:37–44. doi:10.1016/S0921-4488(01)00253-X.
- 292 [20] Webb R, England BG. Identification of the Ovulatory Follicle in the Ewe: Associated  
293 Changes in Follicular Size, Thecal and Granulosa Cell Luteinizing Hormone Receptors,  
294 Antral Fluid Steroids, and Circulating Hormones during the Preovulatory Period.  
295 *Endocrinology* 1982;110:873.
- 296 [21] Mihm M, Baker PJ, Ireland JLH, Smith GW, Coussens PM, Evans ACO, et al. Molecular  
297 Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle-  
298 Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence  
299 in Cattle. *Biol Reprod* 2006;74:1051–9. doi:10.1095/biolreprod.105.045799.
- 300 [22] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and  
301 acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65:1403–9.  
302 doi:10.1095/biolreprod.65.5.1403.
- 303 [23] Martemucci G, D'Alessandro AG. Synchronization of oestrus and ovulation by short  
304 time combined FGA, PGF2, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time.  
305 *Anim Reprod Sci* 2011;123:32–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.007.
- 306 [24] Giordano J, Fricke P, Guenther J, Lopes Jr G, Herlihy M, Nascimento A, et al. Effect of  
307 progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different  
308 doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*  
309 2012;95:3781–93. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5155>.
- 310 [25] Yamada K, Nakao T, Nakada K, Matsuda G. Influence of GnRH analogue (fertirelin  
311 acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in  
312 lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002;74:27–34. doi:10.1016/S0378-  
313 4320(02)00161-6.
- 314 [26] Dias FCF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ, Adams GP, Singh J. Progesterone

- 315 concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect  
316 gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers.  
317 *Domest Anim Endocrinol* 2010;39:155–62. doi:10.1016/j.domaniend.2010.04.002.
- 318 [27] Mendonça LGD, Amstalden M, Chebel RC. Short communication: Insertion of an  
319 intravaginal progesterone device at the time of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)  
320 injection affects neither GnRH-induced release of luteinizing hormone nor development  
321 of dominant follicle in early diestrus of lact. *J Dairy Sci* 2015;98:3918–25.  
322 doi:10.3168/jds.2014-9151.
- 323 [28] Crawford JL, Currie RJW, McNeilly AS. Replenishment of LH stores of gonadotrophs in  
324 relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of  
325 the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol* 2000;167:453–63. doi:10.1677/joe.0.1670453.
- 326 [29] Kaya M, Cenesiz M, Ucar O, Yildiz S. Determination of luteinizing hormone (LH)  
327 response to different doses of lecirelin acetate (a GnRH analogue) in Tuj ewe-lambs. *Rev  
328 Méd Vét* 2008;159:417, 413.
- 329 [30] Rastegarnia A, Niasari-Naslaji A, Hovareshti P, Sarhaddi F, Safaei M. The effect of  
330 different doses of Gonadorelin on ovarian follicle dynamics in river buffalo (*Bubalus  
331 bubalis*). *Theriogenology* 2004;62:1283–91. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.014.
- 332 [31] Squires EL, Moran DM, Farlin ME, Jasko DJ, Keefe TJ, Meyers SA, et al. Effect of dose  
333 of GnRH analog on ovulation in mares. *Theriogenology* 1994;41:757–69.  
334 doi:10.1016/0093-691X(94)90185-L.
- 335 [32] Mirzaei A, Mohebbi-Fani M, Nazifi S, Aghamiri M. Effect of GnRH administration,  
336 combined with the ram effect, on the occurrence of ovulation and pregnancy during the  
337 transition period from anoestrus in crossbred ewes. *Small Rumin Res* 2011;100:59–62.  
338 doi:10.1016/j.smallrumres.2011.06.002.
- 339 [33] Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C, Fierro S. Reproductive outcome with GnRH  
340 inclusion at 24 or 36h following a prostaglandin F<sub>2α</sub>-based protocol for timed AI in  
341 ewes. *Anim Reprod Sci* 2013;138:175–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.02.013.
- 342 [34] Martinez MF, McLeod B, Tattersfield G, Smaill B, Quirke LD, Juengel JL. Successful  
343 induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the  
344 breeding season using a GnRH+progesterone oestrus synchronisation protocol. *Anim  
345 Reprod Sci* 2015;155:28–35. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.01.010.
- 346 [35] Maia VN, Batista AM, Cunha Neto S, Silva DMF, Adrião M, Wischral A. Expression of  
347 angiogenic factors and luteinizing hormone receptors in the corpus luteum of mares  
348 induced to ovulate with deslorelin acetate. *Theriogenology* 2016;85:461–5.  
349 doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.025.

350

351 **Table legends**

352

353 Table 1. Experimental design of the study.

Groups	GnRH agonis	Dose	
		Volume	µg
1	Gonadorelin (Fertagyl ®)	1 mL	100µg
2	Gonadorelin (Fertagyl ®)	0.5 mL	50µg
3	Lecirelin (Gestran Plus ®)	1 mL	25 µg
4	Lecirelin (Gestran Plus ®)	0.5 mL	12.5µg
5	Buserelin acetate (Sincroforte®)	2 mL	8.4 µg
6	Buserelin acetate (Sincroforte®)	1 mL	4.2 µg
7	Deslorelin acetate (Sincrorrelin®)	3 mL	750 µg
8	Deslorelin acetate (Sincrorrelin®)	1.5 mL	375 µg

354

355

356

357 **Figure and table captions**

358

359 Figure 1. Time course of plasma LH concentrations (ng/mL) after an intramuscular  
360 administration of gonadorelin (50 and 100 µg), lecirelin (12.5 and 25 µg), deslorelin (375  
361 and 750 µg), and buserelin (4.2 and 8.4 µg). Asterisks represent statistically significant  
362 differences ( $P < 0.05$ ) of LH concentration according to the doses of GnRH agonist in  
363 each period assayed after administration.

364

365 Figure 2. Average area under the curve (AUC<sub>LH0-6</sub>) of LH concentrations (ng h/mL)  
366 between 0 and 6 h after an intramuscular administration of gonadorelin (50 and 100 µg),  
367 buserelin (4.2 and 8.4 µg), deslorelin (375 and 750 µg), and lecirelin (12.5 and 25 µg).  
368 Values with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ) between doses and GnRH  
369 analogs.

370

Figure 1

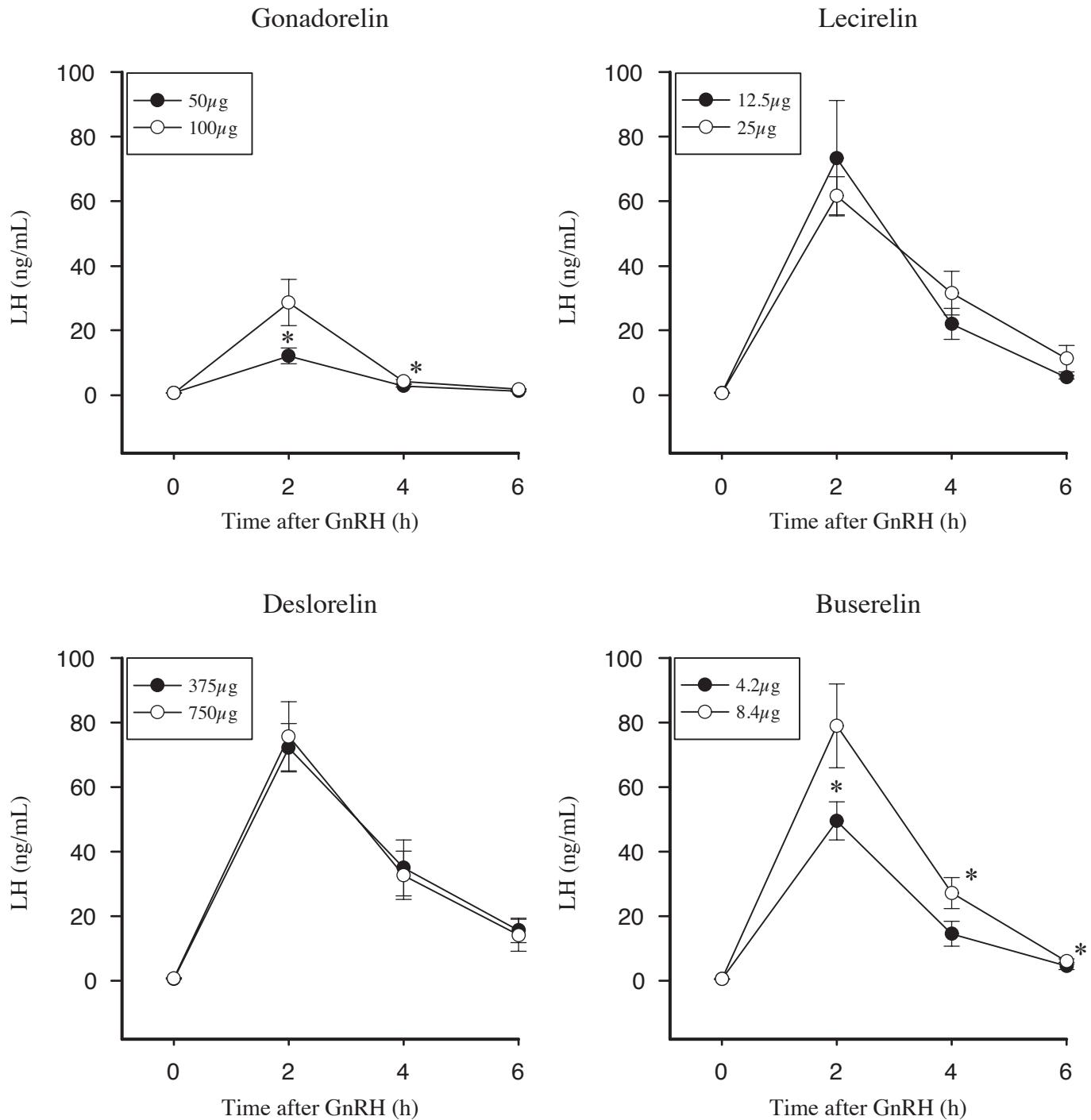
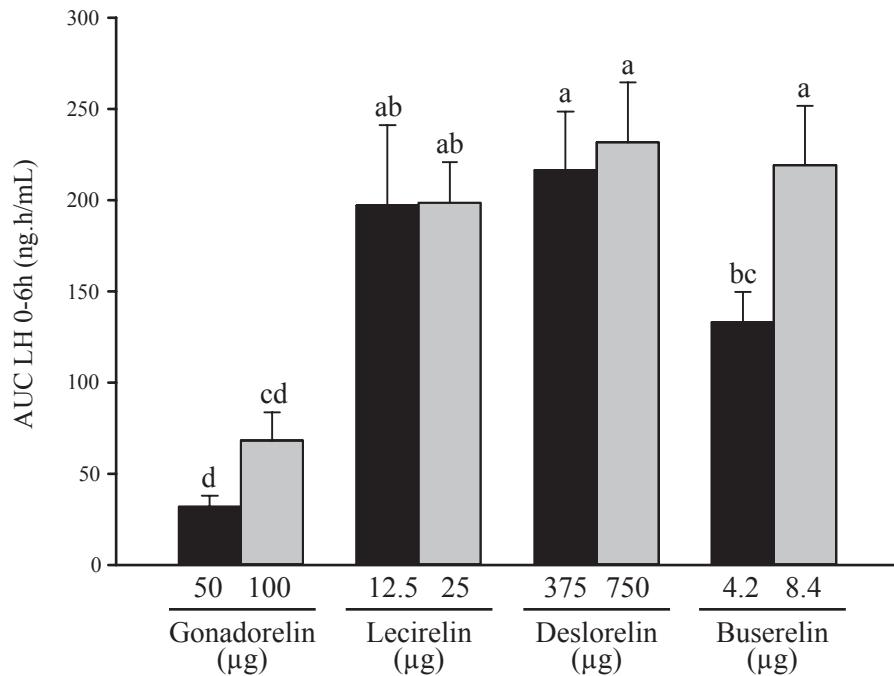


Figure 2



### 3 CONSIDERAÇOES FINAIS

O GnRH atua como um mediador central das funções reprodutivas nos mamíferos, através da produção FSH e produção e liberação de LH. Devido a isso, o mesmo é utilizado em diversos protocolos reprodutivos com intuito de sincronizar e induzir a ovulação, e assim, melhorar a resposta reprodutiva. Na espécie ovina, inúmeros trabalhos têm empregado o GnRH. No entanto, há divergências entre doses e formas sintéticas utilizadas, pois não são consideradas as diferenças moleculares entre análogos e a forma semelhante ao GnRH endógeno. Além disso, ao contrário de outras espécies, como a bovina, na espécie ovina não eram conhecidas quais as doses e formas sintéticas de GnRH mais eficientes em induz a liberação de LH. Assim, o presente estudo permitiu, através da avaliação da quantidade de LH liberada, determinar a resposta das diferentes doses e agonistas mais descritos na literatura. A partir desses resultados, demonstramos que a buserelina, a lecirelina e a deslorelin induziram um efeito maior na liberação de LH do que o tratamento com gonadorelina 50 $\mu$ g. Com isso, os análogos agonistas de GnRH são possivelmente mais eficientes, do que a gonadorelina em indução ovulação. Além disso, com base nas doses testadas e considerando a maior liberação de LH, recomendamos o uso de 12,5  $\mu$ g de lecirelina, 375  $\mu$ g de deslorelin ou 8,4  $\mu$ g de buserelina na indução da ovulação na espécie ovina. Portanto, o presente estudo foi o primeiro a determinar as possíveis doses e agonistas de GnRH a serem recomendados para utilização em protocolos reprodutivos em ovinos.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p.173-179, 2012.
- AZAWI, O. I. al. A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 7, p. 1351, 2011.
- BAIRD, DAVID T.; SWANSTON, IAN; SCARAMUZZI, REX J. Pulsatile Release of LH and Secretion of Ovarian Steroidsin Sheep During the Luteal Phase of the Estrous Cycle. **Endocrinology**, v. 98, n. 6, p. 1490-1496, 1976.
- BAIRD, D. T., et al. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. **Journal of reproduction and fertility**, v.43, p.125-138, 1991.
- BALARO, M. F. A. et al. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the superovulatory Day 0 protocol. **Domestic animal endocrinology**, v. 54, p. 10-14, 2016.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.
- BARTLEWSKI, P. M. et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 275-285, 1998.
- BERGER, H. et al. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pharmacokinetics: peptide hormone pharmacokinetics needs clarification. **Life sciences**, v. 42, n. 9, p. 985-991, 1988.
- BLISS, S. P. et al. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 322-340, 2010.
- BRASIL, O. O. et al. Superovulatory and embryo yielding in sheep using increased exposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 54-58, 2016.
- CAMPBELL, B. K. et al. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. **Journal of reproduction and fertility**, v. 117, n. 2, p. 355-367, 1999.
- CAVALCANTI, A. S. et al. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1412-1418, 2012.
- CHEMINEAU, P. et al. Control of sheep and goat reproduction: use of light melatonin. **Animal Reproduction Science**, v. 30, n. 1-3, p. 157-184, 1992.

CHENAULT, J.R. et al; LH and FSH 211 response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**; v.34, p.81–98, 1990.

CLARKE, I. J.; CUMMINS J.T. Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. **Neuroendocrinology**. v. 39, n.3, p. 267-274, 1984.

CONN, PH. D, P. M.; CROWLEY JR, M.D, W. F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. **Annual review of medicine**, v. 45, n. 1, p. 391-405, 1994.

COMBARNOUS, Y.; SALESSE, R.; GARNIER, J. Physico-chemical properties of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochimica et BiophysicaActa (BBA)-Protein Structure**, v. 667, n. 2, p. 267-276, 1981.

DRIANCOURT, M. A.; GIBSON, W. R.; CAHILL, L. P. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 25, n. 1A, p. 1-15, 1985.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewes?. **Journal of reproduction and fertility**, v. 93, n. 1, p. 63-70, 1991.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

DURÁN-PASTÉN, M. L.; FIORDELISIO, T. GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, 2013.

ESPEY, L. L. et al. Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. **Biology of reproduction**, v. 22, n. 1, p. 73-106, 1980.

EVANS, A. C. O. et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 699-715, 2000.

FERNALD, R. D.; WHITE, R.B. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 224-240, 1999.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 713-719, 2007.

FERRIS, Heather A.; SHUPNIK, Margaret A. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 6, p. 993-998, 2006.

FONTAINE, Emmanuel et al. Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1561-1566, 2011.

- FRICKE, P. M.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1275-1284, 1998.
- GARDNER, Samantha et al. Targeting mediators of Wntsignalling pathways by GnRH in gonadotropes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 44, n. 4, p. 195-201, 2010.
- GIBBONS, J. R. et al. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1005-1020, 1999.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 689-703, 1995.
- GIORDANO, J. O. et al. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 3781-3793, 2012.
- HASHEM, N. M. et al. Oestrous response and characterization of the ovulatory wave following oestrous synchronization using PGF 2 $\alpha$  alone or combined with GnRH in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 84-87, 2015.
- HASHEM, N. M. et al. Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 192-198, 2015.
- HAUACHE, O. M. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia&Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 228-239, 2001.
- HERBERT, C. A.; TRIGG, T. E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 1, p. 141-153, 2005.
- I'ANSON, H.; LEGAN, S. J. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 1, p. 341-351, 1988.
- KAISER, U. B. et al. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1224-1231, 1997.
- KARGES, B.; KARGES, W.; DE ROUX, N. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. **Human reproduction update**, v. 9, n. 6, p. 523-530, 2003.
- KARTEN, M. J.; RIVIER, J. E. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 1, p. 44-66, 1986.

- KAYA, M. et al. Determination of luteinizing hormone (LH) response to different doses of lecirelin acetate (a GnRH analogue) in Tuj ewe-lambs. **Revue Méd. Vét.**, v. 159, n. 7, p. 413-417, 2008.
- KIESEL, L. A. et al. Clinical use of GnRH analogues. **Clinical endocrinology**, v. 56, n. 6, p. 677-687, 2002.
- MEDAN, M. S. et al. Transrectal ultrasonic diagnosis of ovarian follicular cysts in goats and treatment with GnRH. **Domestic animal endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 115-124, 2004.
- MEDEIROS, S. F. de.; MEDEIROS, M. M. W. Y. de. Modificações dos níveis de gonadotrofinas durante a vida reprodutiva. **Rev Bras GinecolObstet**, v.1, p. 48-55, 2007.
- MILLAR, R.P. GnRHs and GnRH receptors. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1, p. 5-28, 2005.
- MORIOKA, N. et al. Mechanism of mammalian ovulation. **Progress in clinical and biological research**, v. 294, p. 65-85, 1989.
- NOEL, Bernard; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 695-700, 1993.
- ORTAVANT, R. et al. Seasonality of Reproduction in Sheep and its Control by Photoperiod. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 41, n.1 p. 69-85, 1988.
- ORTMANN, O.; WEISS, J. M.; DIEDRICH, K. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. **Reproductive biomedicine online**, v. 5, p. 1-7, 2002.
- PADULA, A. M. GnRH analogues—agonists and antagonists. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1, p. 115-126, 2005.
- PANT, H. C.; HOPKINSON, C. R. N.; FITZPATRICK, R. J. Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. **Journal of endocrinology**, v. 73, n. 2, p. 247-255, 1977.
- PERRETT, R. M.; MCARDLE, C. A. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, 2013.
- PETROFF, B. K. et al. A review of mechanisms controlling ovulation with implications for the anovulatory effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rodents. **Toxicology**, v. 158, n. 3, p. 91-107, 2001.
- PICARD-HAGEN, N. et al. Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177-183, 2015.

- PIERSON, J.T. et al. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 397-406, 2003.
- RAWLINGS, N. C.; COOK, S. J. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 30, n.4, p.289-299, 1993.
- REKIK, M. et al. GnRH and prostaglandin-based synchronization protocols as alternatives to progestogen-based treatments in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 6, p. 924-929, 2016.
- REYNA, J. et al. Synchrony of Ovulation and Follicular Dynamics in Merino Ewes Treated with GnRH in the Breeding and Non-breeding Seasons. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 4, p. 410-417, 2007.
- RISPOLI, L. A.; NETT, T. M. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1, p. 57-74, 2005.
- ROMAGNOLI, S. et al. Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. s2, p. 36-39, 2009.
- ROSA, H.j.d; BRYANT, M.j. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 3, p.155-171, 2003.
- RUF, F.; FINK, M.Y.; SEALFON, S. C. Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 181-199, 2003.
- RUSSELL, D.L.; SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2006. p. 217-227.
- RUSSELL, D.I L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human reproduction update**, v. 13, n. 3, p. 289-312, 2007.
- SCARAMUZZI, R. J.; CALDWELL, B. V.; MOOR, R. M. Radioimmunoassay of LH and estrogen during the estrous cycle of the ewe. **Biology of reproduction**, v. 3, n. 1, p. 110-119, 1970.
- SCARAMUZZI, R. J. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, fertility and development**, v. 5, n. 5, p. 459-478, 1993.

SCHANBACHER, B. D.; LUNSTRA, D. D. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finish Landrace and Suffolk rams. **Journal of animal science**, v. 43, n. 3, p. 644-650, 1976.

SCHNEIDER, F.; TOMEK, W.; GRÜNDKER, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 691-709, 2006.

SILVA, A. C. J. de S. et al. Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Femina**, v. 34, n. 7, p. 469-476, 2006.

SIROIS, J. et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 373-385, 2004.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **Journal of reproduction and fertility**, v. 108, n. 1, p. 101-106, 1996.

STICH, K. L. et al. Effects of a new injectable short-term release deslorelin in foal-heat mares. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 831-836, 2004.

TSAFRIRI, A. et al. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. **Prostaglandins**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 1972.

TSUTSUMI, R.; WEBSTER, N. JG. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. **Endocrine journal**, v. 56, n. 6, p. 729-737, 2009.

UILLENBROEK, J. Th J.; RICHARDS, J. S. Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. **Biology of reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1159-1165, 1979.

VIGUIE, Catherine et al. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and luteinizing hormone pulsatile secretion. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 5, p. 1114-1120, 1995.

VONNAHME, K. A. et al. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced regression in sheep. **Reproduction**, v. 131, n. 6, p. 1115-1126, 2006.

WALTER, B. et al. Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1125-1129, 2011.

WEBB, R. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 61, p. 71-90, 2003.

ZAPLETAL, D.; PAVLIK, A. The effect of lecirelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2, p. 306-315, 2008.

## CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA



**UDESC**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DE  
SANTA CATARINA

**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização do GnRH como indutor da ovulação alternativo para ovelhas na contraestação reprodutiva previamente expostas ao eCG e determinação do tamanho ovulatório.", protocolada sob o CEUA nº 3443241116, sob a responsabilidade de **Rogério Ferreira** e equipe; Raquel Grande Pereira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 19/06/2017.

We certify that the proposal "Use of GnRH as alternative for ovulation induction in ewes previously exposed to eCG in non breeding seasons and establishment of ovulatory size.", utilizing 220 Ovines (220 females), protocol number CEUA 3443241116, under the responsibility of **Rogério Ferreira and team**; Raquel Grande Pereira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 06/19/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2016 a 07/2017

Área: Zootecnia

Origem:	Animais de proprietários	sexos:	Fêmeas	idade:	1 a 5 anos	N:	200
Espécie:	Ovinos						
Linhagem:	Lacaune						
Origem:	Animais de proprietários	sexos:	Fêmeas	idade:	2 a 5 anos	N:	20
Espécie:	Ovinos						
Linhagem:	Corriedalle						

Resumo: Os ovinos apresentam um padrão sazonal de fertilidade. Em vista a esta dificuldade, há a necessidade de utilização de biotecnologias reprodutivas, como a aplicação da Gonadotropina Coriônica Equina (eCG) que é responsável por induzir a ovulação na contraestação reprodutiva. No entanto, seu uso repetitivo induz a resposta humoral, resultando na formação de anticorpos anti-eCG que interferem na eficácia dos tratamentos reprodutivos, ocasionando a diminuição dos índices de fertilidade do rebanho. A proposta do presente estudo será avaliar a utilização do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) como indutor da ovulação alternativo ao usual eCG, em ovelhas previamente imunizadas ao eCG, na contraestação reprodutiva. Também será determinado o tamanho ovulatório mínimo em ovinos. No primeiro experimento as ovelhas serão alocações em dois grupos de 100 animais cada, sendo um grupo correspondente aos animais pré-expostos ao eCG e outro sem pré-exposição. Em cada grupo, os animais serão aleatoriamente distribuídos em dois subgrupos de acordo com o indutor da ovulação a ser utilizado (eCG ou GnRH), com 50 repetições em cada; assim, totalizando 200 unidades experimentais. Será mensurado o diâmetro folicular ovariano no oitavo dia após o início da indução do estro e os níveis de progesterona sérica no quinto dia após a monta dirigida, em uma subparcela (10 animais) de cada grupo. A detecção da prenhez será realizada em todos os animais, 25 dias após a monta dirigida. No segundo experimento 20 ovelhas cíclicas serão submetidas a protocolo de indução e sincronização de cio a base de progesterona. Será mensurado o diâmetro folicular ovariano e aplicado LH no sétimo dia após a introdução do implante de progesterona. No dia 09 será realizada a técnica laparoscópica com o intuito de detectar ovulações. Portanto, o presente estudo pretende propor um novo protocolo hormonal, sem o uso de eCG, que se obtenha elevadas taxas de ovulação e prenhez na contraestação reprodutiva. Também será determinada a resposta folicular ovariana à aplicação do LH exógeno em folículos de diferentes tamanhos, sendo possível determinar o tamanho mínimo de um folículo para que a ovulação seja induzida.

Local do experimento: Cabanha Chapecó, localizada na Linha Tormen, pertencente ao município de Chapecó, Santa Catarina.

Lages, 21 de junho de 2017



***Comissão de Ética no  
Uso de Animais***

Marcia Regina Pfuetzenreiter  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina