

ANA PAULA MANTOVANI

Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino

São Paulo

2003

ANA PAULA MANTOVANI

Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Francisco Gacek

São Paulo

2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1296 Mantovani, Ana Paula
FMVZ Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino / Ana Paula Mantovani. -- São Paulo : A. P. Mantovani, 2003.
84 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gacek.

1.Folículo dominante. 2.Progesterona. 3. Corpo lúteo. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: MANTOVANI, Ana Paula

Título: Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Data: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ao meu irmão Alexandre, vivo em minha lembrança, pela oportunidade de crescimento humano e pelo exemplo de vida que me proporcionou, em sua breve passagem por esse mundo.

À você, minha gratidão, meu reconhecimento e minha homenagem eterna...

Aos meus pais, Célia e Celso, cujo exemplo de determinação e coragem já seria suficiente para a realização de muito mais do que este trabalho.

Minha eterna gratidão e admiração à vocês que abriram as portas do meu futuro, sacrificando seus sonhos em função dos meus e, que me deram a vida e me ensinaram a enfrentá-la.

Agradecimentos

À Deus, sempre presente em minha vida, por ter me abençoado sempre, por ter me orientado nos momentos de maiores dificuldades e por ter me dado a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas tão especiais durante esse curso e em toda minha vida.

Ao Prof. Dr. Francisco Gacek, meu orientador e amigo, pelo crédito que depositou nesse trabalho e por aquele que depositou em mim.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, a quem eu tenho inestimável respeito e admiração, por ter me dado o privilégio de participar de seu grupo de pesquisa e por ter auxiliado de maneira essencial durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato e Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe pela enorme dedicação a todos os pós-graduandos do VRA.

Aos veterinários, Pedro, Rubinho, Marinho e Juninho, por acreditarem em nosso trabalho e por terem contribuído de forma imensurável para a realização do mesmo.

À minha mãe, por ter sido minha mais precisa e preciosa ajudante durante os trabalhos de campo. Criteriosa e compenetrada minha mãe, por quem eu já tinha enorme admiração pela dedicação que tem pela família, pelo exemplo de honestidade e determinação, me surpreendeu muito durante a condução dos experimentos à campo.

Aos meus irmãos, Bruno e Eduardo, e à minha cunhada Marisa, minha irmãzinha adotiva, por todo carinho, apoio e amizade que seguramente me fortaleceram nos momentos de dificuldade.

À minha avó Anna, pelo encorajamento e por achar sempre que eu sou até melhor do que realmente sou.

Aos amigos da “velha guarda”, Daniela, Débora, Guga e Raquel, que apesar de tantos desencontros se fizeram sempre presentes. Também a minha “nova” amiga Débora Gabriotti, por fazer do mundo um lugar melhor para se viver.

Ao amigo José Luís Alcoléa pelas palavras amigas, pelo apoio e por tantos ensinamentos.

Às pessoas que eu conheci durante meu curso de pós-graduação que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal, algumas delas sempre com palavras amigas, algumas me dando lições importantes apenas com seus próprios exemplos, fosse me les bons ou ruins, outras me fazendo passar por situações dolorosas, mas que naqueles momentos se fizeram essenciais e outras ainda, combinando todas essas coisas, entre elas Paola Goés, Karina Cavalcante, Luciana, Gutinho, Rogério Dantas, Marcílio, Roger, Thiesa, Vinícius, Sobrinho, Alexandre Barreto, Maria Fernanda, Ana Rita, Daniela Braga, Everton Reis, Taís, Érica, Manoel, Nélcio, Eduardo, Regina e demais colegas do VRA.

À Paola e à Karina por terem contribuído para a realização desse trabalho e por terem me acolhido, em todos os sentidos da palavra, quando mais precisei.

Ao meu amigo Marcílio, pela imensurável colaboração. Sem ele, certamente esse trabalho não seria realizado.

Ao pessoal da Protécnica, em especial ao Marcelo, Ronaldo, Wilson, Edmar e Selma, pela oportunidade, pelo respeito, pelo carinho e principalmente pela amizade. Também às pessoas que conheci por intermédio da Protécnica e que se tornaram importantes pra mim, algumas delas fundamentais para meu amadurecimento, entre elas a Adriana, Amanda, Márcio, Edmundo e especialmente ao Guilherme Gregolin.

Às funcionárias da biblioteca e à todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, principalmente à Harumi, Sílvia, Alice, Jocimar e ao Miguel pela amizade, gentileza e eficiência.

À CAPES, pela bolsa concedida, sem a qual a realização desse trabalho seria muito mais difícil.

À FAPESP, por financiar nosso projeto.

À Schering Plough – Coopers pela doação do Ciosin[®] utilizado neste experimento.

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

Muito Obrigada!

“Há dois tipos de inveja: a boa e a condenável. A boa consiste em, quando encontrares alguém superior a ti desejares ser como ele; a condenável consiste em desejar a sua queda.”

(Máxima Árabe)

RESUMO

MANTOVANI, A. P. **Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino.** [Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR[®]) on the induction of persistent follicles in bovine embryo recipients] 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

Em programas de transferência de embriões, as perdas embrionárias após a inovulação têm sido relacionadas com uma capacidade reduzida do corpo lúteo (CL) em secretar progesterona (P₄), uma vez que este hormônio prepara o endométrio para a implantação e a manutenção da prenhez. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a eficácia da utilização de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) por 14 dias em receptoras de embrião, para a indução de folículos persistentes e formação de CLs maiores do que aqueles formados com a utilização de CIDR[®] por 8 dias. Duzentas e setenta e oito novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* foram divididas em 4 grupos. As receptoras do Grupo 1 (G1, n = 70) receberam 2,0 mg de BE + 50 mg de P₄ por via intramuscular (IM) no dia da colocação do CIDR[®] (D0), oito dias depois (D8), o dispositivo foi retirado e foi aplicado um análogo da prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α} - 0,53 mg de Cloprostenol Sódico) IM pela manhã. No D9, foi aplicado 0,5 mg de BE IM e o D17 foi o dia da inovulação. Os animais do Grupo 2 (G2, n = 71) receberam 2,0 mg de BE + 50 mg de P₄ no dia da colocação do CIDR[®] (D0), todavia, esses animais receberam 2 aplicações de PGF_{2α}, uma no início do tratamento e outra 5 dias depois. Nestes animais, o CIDR[®] foi mantido por 14 dias; assim, no D15 foi aplicado 0,5 mg de BE e o dia da inovulação, foi o D23. No Grupo 3 (G3, n = 67), o tratamento foi semelhante ao do G2, no entanto a PGF_{2α} foi aplicada uma única vez, 5 dias após o início do tratamento. No Grupo 4 (G4, n = 70), o tratamento foi semelhante ao do G2, tendo os animais recebido 2 aplicações de PGF_{2α}, uma no dia da colocação do CIDR[®] e outra no dia da retirada. A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada um dia após a retirada do CIDR[®] e no dia da inovulação, quando foram colhidas amostras de sangue para dosagem de P₄. O diâmetro médio do folículo dominante (FD) foi maior nos grupos G2, G3 e G4 quando comparado com o grupo G1. A área do CL, a concentração plasmática de P₄ e a taxa de aproveitamento foram maiores nos grupos G2 e G3 que no grupo G1, enquanto o grupo G4 não diferiu estatisticamente dos demais. A taxa de concepção nos grupos G2 e G3 foi inferior àquela do grupo G1, mas não diferiu entre o grupo G4 e os demais. A taxa de prenhez não apresentou diferença estatística entre os grupos. Esses resultados sugerem que a utilização de CIDR[®] por tempo prolongado, quando associada à aplicação de PGF_{2α} no início do tratamento, é eficaz na formação de folículos persistentes, que resultam em CLs aumentados e com maior capacidade de secretar P₄. No entanto, ao contrário do esperado, a taxa de concepção foi reduzida nos grupos em que o tratamento visava a formação de folículos persistentes.

Palavras-chave: Folículo dominante. Progesterona. Corpo lúteo.

ABSTRACT

MANTOVANI, A. P. **Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR®) on the induction of persistent follicles in bovine embryo recipients.** [Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR®) na indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino] 2003. 84 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

Embryo losses in cattle embryo transfer programs have been related to a corpus luteum (CL) inability to secrete progesterone (P_4), necessary to endometrial preparation for embryo implantation and pregnancy maintenance. Thus the objective of this experiment was to evaluate the efficacy of a treatment with progesterone-releasing intravaginal devices (CIDR®) for a period of 14 days in order to induce the formation of a persistent follicle and a CL of larger diameter than the ones produced during the conventional 8 days CIDR® treatment. Two hundred seventy-eight cross-bred *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers were randomly allocated in four groups. Heifers in Group 1 (G1, n = 70) received 2.0 mg estradiol benzoate (EB) + 50 mg of P_4 at the moment of CIDR® insertion (D0), a 0.53 mg injection of cloprostenol ($PGF_{2\alpha}$ analogues) at the time of CIDR® removal (D8) and 0.5 mg EB on D9. On D17 animals received a frozen/thawed embryo by direct transfer. Heifers in Group 2 (G2, n = 71) received a CIDR® device combined with 2.0 mg of EB + 50 mg of P_4 (D0). Animals of this group received 2 injections of $PGF_{2\alpha}$, one on D0 and the other on D5. The CIDR® was removed on D14. A 0.5 mg injection of EB was administered on D15. The treatment in Group 3 (G3, n = 67) was similar to G2, except by the fact that a single injection of $PGF_{2\alpha}$ was administered on D5. Treatment performed on animals of Group 4 was similar to the one performed on G2. However, animals of this group received two injections of $PGF_{2\alpha}$, one at the time of CIDR® insertion and the other at the moment of its removal. Ovarian ultrasonography was performed on the day after CIDR® removal and at the day of embryo transfer. Blood samples for P_4 analysis were also collected on the day of embryo transfer. Mean diameter of the dominant follicle was larger in heifers in G2, G3 and G4 when compared to G1. The CL area, plasma progesterone concentrations and recipient selection rate was greater in G2 and G3 than in G1, but G4 was not different of the other groups. Conception rates were lower in G2 and G3 when compared to G1. No differences between groups were found regarding to the pregnancy rates. These results suggest that a CIDR® long-term treatment, when associated with $PGF_{2\alpha}$ in the beginning of the treatment is efficient to stimulate the formation of a persistent follicle, resulting in a larger CL which provides higher P_4 concentration. However, the induction of a persistent follicle had a negative effect on the conception rates which was not expected.

Key words: Dominant follicle. Progesterone. Corpus luteum.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Receptoras utilizadas em uma das réplicas do experimento. Cornélio Procópio - PR, 2002 50
- Figura 2** – Imagens ultrassonográficas ilustrando o maior diâmetro do folículo dominante nos grupos 2, 3 e 4 (figura 2b, 2c e 2d respectivamente) do que no grupo 1 (figura 2a) 59
- Figura 3** – Imagens ultrassonográficas de corpos lúteos obtidos nos grupos 1, 2, 3 e 4 (figuras 3a, 3b, 3c e 3d respectivamente) 60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Diagrama esquemático do experimento.....	54
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Correlação entre o diâmetro do FD (mm) um dia após a retirada do CIDR[®] e a área do CL (cm²) no momento da inovulação em receptoras de embrião bovino (r = 0,35326; p = 0,0004). Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002 62
- Gráfico 2** – Correlação entre o diâmetro do FD (mm) um dia após a retirada do CIDR[®] e a concentração plasmática de P₄ (ng/ml) no momento da inovulação em receptoras de embrião bovino (r = 0,3939; p < 0,0001). Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002 63
- Gráfico 3** – Correlação entre a área do CL (cm²) e a concentração plasmática de P₄ (ng/ml) no momento da inovulação em receptoras de embrião bovino (r = 0,43316; p < 0,0001). Cornélio Procópio – PR e Itararé - SP, 2002 64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Diâmetro do FD, área do CL e concentração plasmática de P_4 (média \pm erro padrão da média) em receptoras de embrião bovino tratadas com CIDR[®] por 8 dias e por 14 dias, associado com a administração de $PGF_{2\alpha}$ em diferentes momentos do tratamento. Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002 58
- Tabela 2** – Taxa de aproveitamento, concepção e prenhez em receptoras de embrião bovino tratadas com CIDR[®] por 8 dias (G1), e com CIDR[®] por 14 dias associado com a administração de $PGF_{2\alpha}$ em diferentes momentos do tratamento. Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	benzoato de estradiol
CL	corpo lúteo
CLa	corpo lúteo acessório
CIDR	<i>controlled internal drug release</i>
CNA	confederação nacional da agricultura
E ₂	estradiol
D0	dia 0 – início do tratamento
eCG	gonadotrofina coriônica equina
FD	folículo dominante
FMVZ	faculdade de medicina veterinária e zootecnia
FSH	hormônio folículo estimulante
G1	grupo 01
G2	grupo 02
G3	grupo 03
G4	grupo 04
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IA	inseminação artificial
IFN- τ	interferon-tau
IM	intramuscular
LH	hormônio luteinizante

Ltda.	limitada
MGA	acetato de melengestrol
MOET	<i>multiple ovulation and embryo transfer</i>
PR	Paraná
RIA	radioimunoensaio
SP	São Paulo
TE	transferência de embrião
OIE	organização internacional de epizootias
P ₄	progesterona
PGF _{2α}	prostaglandina
PGFM	metabólito da prostaglandina
PRID	<i>progesterone releasing intravaginal device</i>
rBST	somatotropina bovina recombinante
UI	unidade internacional
USP	universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
g	giros
mg	miligrama
Mhz	megahertz
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
ng	nanograma
Ø	diâmetro
%	porcentagem
®	marca registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	HIPÓTESE	22
3	OBJETIVOS	24
4	REVISÃO DE LITERATURA	26
4.1	CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR.....	27
4.2	CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL E DA OVULAÇÃO EM RECEPTORAS DE EMBRIÃO.....	30
4.2.1	Prostaglandina	30
4.2.2	Progestágenos	32
4.2.3	Progestágenos e Estrógenos	35
4.2.4	GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas	38
4.3	FORMAÇÃO DE FOLÍCULOS PERSISTENTES.....	40
4.4	MECANISMOS DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA	41
4.5	TRATAMENTOS DESTINADOS A AUMENTAR AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA E AS TAXAS DE PRENHEZ EM RECEPTORAS.....	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1	ANIMAIS, LOCAL DO EXPERIMENTO E TRATAMENTOS.....	50
5.2	ULTRASSONOGRAFIA OVARIANA E DIAGNÓSTICO DE PRENHEZ.....	52
5.3	COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA.....	53
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55

6	RESULTADOS	58
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte nacional é responsável por 9% do Produto Interno Bruto (CEPEA, 2003) e o Brasil ocupa a posição de terceiro maior produtor e segundo maior exportador mundial de carne bovina.

Estes dados refletem um crescimento considerável do setor nos últimos anos e têm estimulado os produtores a melhorar a qualidade e a produtividade dos seus rebanhos, concentrando esforços direcionados ao combate de doenças como a febre aftosa, ao controle e erradicação da brucelose e da tuberculose, bem como à adoção de técnicas que intensifiquem a produção através da incorporação de novas tecnologias.

Nesse contexto, o uso de biotecnologias aplicadas à reprodução têm sido de enorme importância para o aumento da produtividade dos rebanhos e para seu melhoramento genético.

A aplicação das técnicas de inseminação artificial (IA) e de congelamento de sêmen no Brasil iniciou-se na década de 50 e possibilitou, além do aumento da produtividade dos rebanhos, a utilização intensiva de touros de alto valor genético.

Já as técnicas de superovulação e transferência de embriões (MOET) são mais recentes e permitem o aumento da disseminação de material genético feminino (FERRAZ; ELLER, 1999), uma vez que possibilitam a obtenção de, em média, 12 bezerros por ano de uma mesma doadora geneticamente superior.

Dentre os inúmeros fatores que afetam a eficiência dos programas de transferência de embriões, as receptoras merecem enfoque especial, uma vez que as perdas embrionárias após inóculo são de grande relevância. Essas perdas têm sido relacionadas com uma capacidade insuficiente do corpo lúteo (CL) de secretar progesterona (P_4), ou com uma ineficiência do

concepto em emitir sinais bioquímicos específicos que suprimam a síntese de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), levando a consequente luteólise e retorno ao estro (BINELLI, 2000).

A presença de um CL ativo que garanta concentrações elevadas de P_4 , responsável pelo preparo do endométrio, é fundamental para o estabelecimento e manutenção da prenhez (FIELDS; FIELDS, 1996). Desta forma, métodos que proporcionem aumento dos níveis circulantes de P_4 em receptoras de embriões podem permitir a redução das perdas embrionárias relacionadas com a presença de um CL funcionalmente insuficiente.

Hipótese

2 HIPÓTESE

Este trabalho verifica a hipótese de que o uso de dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR[®]) por tempo prolongado possa induzir a formação de folículos de maior diâmetro, o que levaria à formação de corpos lúteos com dimensões aumentadas apresentando, assim, maior capacidade de produzir e secretar P₄ e sendo conseqüentemente, mais eficazes para a manutenção da prenhez.

Objetivos

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- estudar a eficácia da utilização do CIDR[®] por 14 dias associado à PGF_{2α}, para a indução de folículos persistentes e a formação de CLs de maior diâmetro e com maior capacidade de secretar P₄ do que aqueles formados com a utilização do CIDR[®] por apenas 8 dias;
- analisar a correlação entre o diâmetro do folículo dominante (FD) e a área do CL, bem como as correlações entre esses parâmetros e as concentrações plasmáticas de P₄;
- verificar as taxas de aproveitamento, concepção e prenhez dos animais tratados com CIDR[®] por 8 ou 14 dias;
- testar a eficácia da aplicação de 2 doses de PGF_{2α}, uma no início do tratamento e outra 5 dias após, em comparação com a aplicação de uma única dose de PGF_{2α}, no 5^o dia do protocolo, em animais que permaneceram com o CIDR[®] por 14 dias;
- comparar a eficácia da aplicação de uma dose de PGF_{2α} no 5^o dia após a colocação do CIDR[®], em relação à aplicação de PGF_{2α} no dia da colocação e no momento da sua retirada, em animais que permaneceram com o dispositivo por 14 dias.

Revisão de Literatura

4 REVISÃO DA LITERATURA

A pecuária de corte no Brasil atravessa um período extremamente favorável. No panorama mundial, alguns acontecimentos, como a crise na Argentina, a ocorrência da encefalopatia espongiforme bovina (“doença da vaca louca”) na Europa e a demanda mundial por produtos naturais, valorizaram sobremaneira a carne bovina brasileira. Além disso, alguns fatores internos, como a pressão competitiva da carne de frango e da carne suína, o emprego da rastreabilidade, o potencial nacional para a produção do boi verde e o fato de grande parte do território brasileiro ser considerado zona livre de febre aftosa com vacinação (OIE, 2003), favorecem ainda mais este setor.

Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA, 2003), as exportações de carne bovina, de janeiro a maio de 2002, renderam US\$ 425 milhões, um aumento de 23,3% em relação ao mesmo período de 2001. Com 167 milhões de cabeças, o país possui o maior rebanho comercial do mundo, com perspectiva de se tornar o maior exportador de carne bovina. Esse bom desempenho no mercado externo dependerá basicamente de um aumento nos índices de produtividade, que poderão ser alcançados através do emprego de técnicas que visem o aumento na qualidade de seus produtos, a custos minimizados.

Nesse contexto, a utilização de cruzamentos industriais e o melhoramento genético através de biotecnologias aplicadas à reprodução têm sido de grande importância para o melhoramento da produção agropecuária em todo o mundo. Em relação a essas tecnologias, a transferência de embriões (TE) é a mais utilizada no mundo para a disseminação de material genético feminino de alto valor e, desde a década de 70, com a introdução de técnicas não cirúrgicas para colheita e transferência dos embriões (KUZAN; SEIDEL, 1986) têm sido

aplicada visando o melhoramento dentro de rebanhos e a facilitação da importação e da multiplicação de raças (BERGMANN; PENNA, 1999).

Apesar das incontestáveis vantagens, a TE apresenta ainda algumas limitações. A variabilidade nas respostas aos tratamentos hormonais e os esforços necessários para a execução dos protocolos e, principalmente, para a detecção do cio, restringem consideravelmente a difusão dessa tecnologia (BÓ et al., 2002). Além disso, a seleção e o manejo adequados das receptoras de embrião são imprescindíveis para o sucesso dos programas de TE, uma vez que a mortalidade embrionária após a inovulação é ainda expressiva e limita sobremaneira a eficiência dessa técnica.

Atualmente, o melhor conhecimento da fisiologia do ciclo estral dos bovinos tem proporcionado perspectivas otimistas quanto ao controle mais preciso tanto do desenvolvimento folicular como do luteal, aumentando a possibilidade de sucesso na sincronização da ovulação em receptoras sem a necessidade de detecção de cio, bem como no desenvolvimento de tratamentos que aumentam as taxas de concepção e prenhez em programas de TE.

4.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR

O ciclo estral em fêmeas bovinas tem duração média de 21 dias e é caracterizado, em 95% dos ciclos, pelo desenvolvimento de duas ou três ondas foliculares (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989).

A emergência da onda folicular é caracterizada por um crescimento sincrônico de mais de 20 pequenos folículos com diâmetro de aproximadamente 3 a 4 mm (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989). Durante os dois primeiros dias, esses folículos apresentam uma

taxa de crescimento semelhante, quando então, um folículo é selecionado para continuar a se desenvolver (folículo dominante), enquanto os demais interrompem seu crescimento e entram em atresia (folículos subordinados) (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

Todos os folículos recrutados são potencialmente capazes de ovular, uma vez que a ablação de todos, exceto um, não interfere no momento da ovulação (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997). Além disso, um dos folículos subordinados pode se tornar dominante se o folículo dominante original for removido (ADAMS et al., 1993; KÓ et al., 1991). Assim, os fatores que determinam a seleção de um folículo específico para continuar seu crescimento ainda não estão esclarecidos mas, em todas as espécies, o folículo dominante parece ser o primeiro a adquirir receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa (DRIANCOURT, 2001).

Durante o período de dominância não ocorre recrutamento de uma nova onda folicular, e a ausência de novo recrutamento parece estar diretamente relacionada com a presença do folículo dominante, uma vez que a cauterização do mesmo induz a imediata emergência de uma nova onda folicular (KÓ et al., 1991).

Tanto em ciclos estrais com duas como com três ondas foliculares, a emergência da primeira onda ocorre consistentemente no dia da ovulação (dia 0), quando se verifica um pico transitório de hormônio folículo estimulante (FSH) na corrente sanguínea (ADAMS et al., 1992). Esse pico de FSH se mantém por 2 ou 3 dias e permite um crescimento folicular considerável, de forma que alguns folículos adquirem responsividade ao LH (GINTHER et al., 1996).

Subseqüentemente, o FSH na circulação é suprimido por uma retroalimentação negativa de produtos foliculares como o estradiol (E_2) e a inibina. Nessa situação, os folículos responsivos ao LH e capazes de sobreviver com baixos níveis de FSH têm uma vantagem competitiva sobre os demais, que entrarão em atresia (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

Nesta fase, a contínua supressão do LH pela P₄ proveniente do CL faz com que o folículo dominante cesse suas funções metabólicas e também entre em atresia, permitindo um novo pico de FSH e a emergência de uma nova onda folicular (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

A emergência da segunda onda folicular normalmente ocorre no dia 9 ou 10 em ciclos com duas ondas, e no dia 8 ou 9 em ciclos com três ondas. Nos ciclos com três ondas, uma terceira onda emerge no dia 15 ou 16. Dessa forma, sucessivas ondas foliculares permanecerão anovulatórias até que a luteólise ocorra (BERGFELT; KASTELIC; GINTHER, 1991).

O fim da supressão progesterônica (luteólise) permite um aumento na frequência dos pulsos de LH, que determina um crescimento ulterior do folículo dominante e conseqüente aumento das concentrações circulantes de E₂ (CUPP et al., 1995). Nesta fase, a amplitude dos pulsos de LH são aumentadas pelo acréscimo nas quantidades de E₂, que, subseqüentemente, irão induzir o pico pré-ovulatório de LH (STUMPF et al., 1991).

O folículo dominante presente no momento da luteólise tornar-se-á o folículo ovulatório. O CL começa a regredir mais cedo nos ciclos com duas ondas (dia 16) que nos ciclos com três ondas (dia 19), o que acarreta um ciclo estral mais curto (20 dias e 23 dias, para ciclos com duas e três ondas, respectivamente). Assim, a duração do ciclo estral pode sugerir a quantidade de ondas foliculares ocorridas no ciclo (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

4.2 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL E DA OVULAÇÃO EM RECEPTORAS DE EMBRIÃO

A variabilidade na resposta aos tratamentos hormonais e as dificuldades encontradas para a detecção de estro, limitam sobremaneira a maior aplicação e o sucesso dos programas de superovulação e transferência de embriões em bovinos.

Estudos mais recentes têm possibilitado o controle da dinâmica folicular, da fase luteal e do momento da ovulação. Esses protocolos permitem a programação do início dos tratamentos de superestimulação, a inseminação artificial em tempo fixo e a possibilidade de sincronização de estro sem a necessidade de detecção de cio em receptoras de embrião.

O desenvolvimento folicular pode ser controlado mecanicamente através da ablação folicular, ou por tratamentos hormonais com hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou com progestágenos em combinação com estradiol. Já a fase luteal pode ser reduzida pela administração de análogos da prostaglandina ou prolongada através da utilização de progestágenos.

4.2.1 Prostaglandina

A $PGF_{2\alpha}$ foi descoberta como uma luteolisina natural no início da década de 70 (McCRACKEN, 1972). A partir de então, esta substância e seus análogos têm sido os agentes farmacológicos mais utilizados nos tratamentos para sincronização do estro em fêmeas bovinas (ODDE, 1990).

O sucesso da sincronização do estro com $\text{PGF}_{2\alpha}$ depende da presença de um CL, já que a ação da mesma é provocar a regressão morfológica e funcional dessa estrutura (RATHBONE et al., 2001).

A maturidade do CL no momento da aplicação da prostaglandina influencia a resposta luteolítica. Assim, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não induz efetivamente a luteólise durante os primeiros 5 ou 6 dias após o estro (MOMONT; SEGUIN, 1984). Acreditava-se que essa falta de responsividade do CL imaturo fosse decorrente de uma deficiência em número ou afinidade de receptores para a $\text{PGF}_{2\alpha}$; todavia, a presença de receptores com alta afinidade para $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL foi demonstrada a partir de dois dias após a ovulação (WILTBANK et al., 1995). Verificou-se que o CL maduro possui um sistema de retroalimentação positiva que resulta na produção intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$, possibilitando a continuidade do processo luteolítico iniciado por uma única aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (WILTBANK, 1997).

Nas fêmeas em que se verifica efetivamente a luteólise, a ocorrência do estro é distribuída num intervalo de mais de seis dias, o que torna impraticáveis os programas de inseminação e transferência em tempo fixo (BÓ et al., 2002). Esta variação no intervalo entre a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o estro e a ovulação, é decorrente do estado de desenvolvimento das ondas foliculares no momento do tratamento (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000). Dessa forma, se o tratamento é realizado quando o folículo dominante está na fase final do seu crescimento, ou no início da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer dentro de 3 ou 4 dias; por outro lado, se a $\text{PGF}_{2\alpha}$ for aplicada quando o folículo dominante estiver no meio ou no final da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer 5 a 7 dias mais tarde, após o crescimento do folículo dominante da próxima onda folicular (KASTELIC; GINTHER, 1991).

A grande variação no intervalo de tempo entre o tratamento e a ovulação, reforçam a necessidade de protocolos destinados a controlar tanto o estado luteal quanto o folicular, para

possibilitar a inseminação artificial em tempo fixo e a sincronização do estro, sem a necessidade de detecção do cio nas fêmeas receptoras (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

4.2.2 Progestágenos

Os progestágenos são compostos similares à P_4 . Podem ser administrados por via oral, como o acetato de melengestrol (MGA), por meio de implantes subcutâneos de norgestomet (Crestar e Syncro-Mate-B), ou através de dispositivos intravaginais da própria P_4 (CIDR-B[®] e PRID) (BÓ, 2000).

Tais compostos têm sido utilizados desde a década de 60 com o objetivo de simular uma fase luteal por períodos que permitam a regressão espontânea do CL, o que leva a uma sincronização do estro dentro de aproximadamente 4 dias após a remoção do agente progestacional, iniciando-se aos 2 dias (RATHBONE et al., 2001).

A liberação de LH pela hipófise é primariamente controlada pela P_4 e pelo E_2 (KINDER et al., 1996). Assim, a ovariectomia de fêmeas bovinas adultas resulta em aumento na frequência dos pulsos de LH pela hipófise (HOBSON; HANSEL, 1972; SCHALLENBERGER, PETERSON, 1982), enquanto a administração de P_4 nas fêmeas ovariectomizadas resulta na supressão da liberação de LH (BECK et al., 1976).

No início da fase luteal (2 ou 3 dias após a ovulação, quando o CL ainda não está completamente formado), as concentrações de P_4 são menores e os pulsos de LH ocorrem numa frequência maior do que no meio da fase luteal (CUPP et al., 1995; PETERS et al., 1994). O mesmo ocorre após a luteólise, quando há maior concentração e frequência dos pulsos de LH, em consequência de uma concentração mais baixa de P_4 circulante (IMAKAWA et al., 1986).

A frequência dos pulsos de LH é controlada pelas doses de P_4 administradas. Quando a P_4 é administrada em altas doses, a frequência dos pulsos é menor do que quando são administradas doses menores (ROBERSON et al., 1989).

No entanto, esses autores observaram que a liberação de LH após a administração de altas doses de P_4 foi maior quando comparada àquela encontrada na presença de um CL funcional, apesar das concentrações plasmáticas desse esteróide terem sido similares nos dois grupos avaliados. Resultados semelhantes foram obtidos por Kojima et al. (1992), em que a P_4 exógena não suprimiu a liberação dos pulsos de LH na mesma extensão que a P_4 endógena secretada pelo CL.

Por outro lado, Bergfeld et al. (1995) trataram um grupo de fêmeas com diferentes doses de P_4 , que resultou numa variação em suas concentrações plasmáticas; outro grupo de fêmeas foi tratado com diferentes doses de $PGF_{2\alpha}$ com o objetivo de destruir parcialmente o CL e causar variações nas concentrações plasmáticas de P_4 . Os pulsos de LH tiveram menor frequência concomitantemente com as maiores concentrações de P_4 , independentemente de sua fonte ser endógena ou exógena. Esses resultados indicam que a P_4 exógena ou endógena possui efeito semelhante no controle da liberação de LH, ao contrário do que foi proposto por Kojima et al. (1992) e por Roberson et al. (1989).

Sanchez et al. (1995) observaram que vacas tratadas com 4 implantes de norgestomet apresentaram frequências de pulsos de LH similares às de vacas em sua fase luteal. No entanto, estes autores verificaram que a frequência dos pulsos de LH era maior no final do tratamento do que durante o seu período inicial, mesmo quando o norgestomet havia sido administrado em doses 8 vezes maiores que as usadas comercialmente.

Baseado na variação da frequência dos pulsos de LH durante o tratamento com progestágeno, foi especulado que a maior frequência encontrada em vacas tratadas com progestágenos quando comparadas com aquelas em sua fase luteal, mesmo na presença de

concentrações plasmáticas de P_4 similares, como observado por Kojima et al. (1992) e Roberson et al. (1989), foi devida ao fato da avaliação do padrão dos pulsos de LH, ter sido realizada um dia antes do final do tratamento com progestágeno, sendo que, se o padrão de liberação de LH tivesse sido avaliado no início do tratamento, a frequência dos pulsos de LH provavelmente teria sido menor do que a encontrada (KINDER et al., 1996).

A P_4 inibe o estro, a ovulação e altera a dinâmica folicular, atuando sobre o hipotálamo e regulando a liberação GnRH (MIHM; AUSTIN, 2002; PETERS et al., 1994) e, conseqüentemente, do LH (KINDER et al., 1996). Assim, a administração de progestágenos por um período suficiente para permitir a regressão natural do CL (ou seja, 14 dias ou mais) pode induzir o estro sincronizado (RATHBONE et al., 2001), uma vez que a supressão do tratamento progestacional leva à ocorrência do pico de LH e à ovulação (KESNER; PADMANABHAN; CONVEY, 1982).

O tratamento com progestágenos por tempo prolongado, de 14 a 21 dias, é efetivo para a sincronização do estro, no entanto, a fertilidade deste estro sincronizado é reduzida (ODDE, 1990). A maior sincronia obtida pelo tratamento com progestágeno por tempo prolongado ocorre porque o padrão de desenvolvimento de ondas foliculares não é mantido, e o folículo dominante de tamanho acima do normal persiste até que o tratamento seja interrompido (LARSON; BALL, 1992; SIROIS; FORTUNE, 1990). Assim, a ovulação destes folículos persistentes pode ser a razão da baixa fertilidade decorrente da sincronização do estro com a utilização de progestágenos (ODDE, 1990; SAVIO et al., 1993).

4.2.3 Progestágenos e Estrógenos

O uso de prostaglandina e de progestágenos em programas de sincronização do estro tem se baseado na redução ou no prolongamento da fase luteal. Entretanto, a sincronização do estro e da ovulação não depende somente do controle da fase luteal, mas também do controle do desenvolvimento folicular (KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990; KASTELIC; GINTHER, 1991).

A fase do desenvolvimento folicular poderia ser avaliada por uma série de exames ultrassonográficos e a sincronização do estro seria, então, iniciada de acordo com a mesma. Todavia, essas observações consumiriam muito tempo e trabalho; assim, uma alternativa seria a indução eletiva da emergência de uma onda folicular para garantir a presença de um folículo dominante em sua fase final de crescimento no momento da indução da luteólise ou da retirada do progestágeno (BÓ et al., 1995).

Vários trabalhos sugerem que a emergência de uma nova onda folicular está relacionada com a remoção do efeito supressivo do folículo dominante. A remoção do folículo dominante por eletrocautério durante laparotomia acelerou a emergência da próxima onda folicular (ADAMS et al., 1993; KÓ et al., 1991). Da mesma forma, a ablação guiada por ultrassom transvaginal de todos os folículos maiores que 5 mm de diâmetro foi seguida por aumento nas concentrações plasmáticas de FSH e emergência de uma nova onda folicular dentro de 2 dias (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS, 1994).

Mais recentemente, um protocolo de ablação mais administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 4 dias mais tarde foi seguido por uma aplicação de GnRH ou LH para aumentar a sincronia da ovulação. Das 23 novilhas tratadas com LH ou com GnRH, todas ovularam dentro de um período de 24 horas, sendo que 19 ovularam dentro de um período de 12 horas (BROGLIATTI; SALAMONE; ADAMS, 1997). Entretanto, apesar da ablação folicular ser uma técnica

relativamente fácil, esse procedimento não tem a simplicidade de um tratamento injetável (MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000).

A administração de E_2 suprime a fase de crescimento do folículo dominante, tendo-se observado que esta supressão é mais intensa quando o tratamento é combinado com P_4 (BÓ et al., 1995). O mecanismo responsável pela supressão do folículo dominante ainda não está bem esclarecido, mas parece ser mais um efeito sistêmico do que local, envolvendo a supressão do FSH e, possivelmente, do LH (BÓ et al., 1994; MIHM et al., 2002).

Novilhas com implante auricular de progestágeno tratadas com 17β -estradiol no início ou no meio da fase de desenvolvimento folicular (dia 1 ou dia 3 do ciclo) tiveram o crescimento do seu folículo finalizado, resultando na emergência de uma nova onda folicular 3 a 5 dias depois (BÓ et al., 1994).

É importante que elevados níveis de P_4 estejam presentes no momento da administração de E_2 , já que um pico de LH foi detectado em novilhas tratadas somente com 17β -estradiol, ao contrário de novilhas com um implante de progestágeno (BÓ et al., 1994). Além disso, quando o estrógeno foi aplicado isoladamente, a supressão do folículo dominante não foi tão evidente como a observada quando o estrógeno foi aplicado simultaneamente com a P_4 , provavelmente porque, quando o estrógeno é aplicado com o progestágeno, as concentrações de FSH permanecem baixas por 24 horas, enquanto a aplicação apenas do E_2 mantém baixas as concentrações de FSH por apenas 6 horas, elevando-se expressivamente 12 horas após, concomitantemente com o pico de LH (BÓ et al., 1994).

A aplicação de benzoato de estradiol (BE) induz efetivamente a emergência de uma nova onda folicular 4 dias após o tratamento, quando este é realizado conjuntamente com 50 mg de P_4 no momento da colocação do implante de progestágeno (CACCIA; BÓ, 1998). Portanto, o estrógeno deve ser aplicado juntamente com 50 a 100 mg de P_4 no mesmo dia da colocação do implante de progestágeno, ou isoladamente no dia seguinte (MAPLETOFT; BÓ;

ADAMS, 2000), já que a emergência da onda folicular é menos variável nos animais tratados com BE juntamente com a P₄ no momento da colocação do implante de progestágeno do que nos tratados somente com BE no dia da colocação do implante (MORENO et al., 2001).

O uso do valerato de estradiol (BÓ et al., 1995; MAPLETOFT et al., 1999) ou do cipionato de estradiol (THUNDATHIL et al., 1998) provoca a regressão folicular, mas sua longa meia-vida resulta numa emergência da onda em um intervalo de tempo menos previsível do que a determinada por fármacos de ação mais curta, como o 17 β -estradiol (BÓ et al., 1995) e o benzoato de estradiol (CACCIA; BÓ, 1998).

Com o objetivo de eliminar a necessidade de detecção de estro, foi utilizado recentemente um tratamento com E₂ associado à P₄ em receptoras com CIDR[®] (TRIBULO et al., 2000). Vacas receberam uma injeção de BE juntamente com P₄ no momento da colocação do CIDR[®] (dia 0). No dia 7 procedeu-se à remoção do dispositivo, juntamente com uma aplicação de PGF_{2 α} , no dia 8 foi feita uma segunda administração de BE e o dia 9 foi considerado o dia do estro. As fêmeas do grupo controle receberam duas doses de PGF_{2 α} com 14 dias de intervalo cada uma, tendo sido observadas durante 5 dias para detecção do cio. Sete dias após a observação do estro (controle) ou do momento esperado do estro, todas as vacas com CL aparentemente funcional receberam embriões congelados; não foi observada diferença nas taxas de prenhez entre os dois grupos. Trabalho semelhante foi realizado por BÓ (2000), que obteve taxa de prenhez de 53,3% no grupo controle e de 62,7% no grupo tratado com BE e P₄ associado ao CIDR[®].

Esses resultados sugerem que o tratamento com BE e P₄ no momento da colocação do CIDR[®], associado a uma segunda aplicação de BE, seja eficaz para sincronizar a ovulação e eliminar a necessidade de detecção do estro, em vacas receptoras de embrião.

4.2.4 GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

A administração de GnRH promove a ovulação ou a luteinização do folículo dominante se este estiver em sua fase de crescimento ou no início de sua fase estática, mas promove sua regressão se este não for mais viável, resultando na emergência de uma nova onda folicular dentro de 2 ou 3 dias (MARTINEZ et al., 1997).

Segundo Clarke (1989), a resposta folicular frente ao tratamento com GnRH deve-se à liberação de LH, sendo que a concentração plasmática de P_4 proveniente da fase luteínica não afeta a resposta hipofisária ao GnRH, uma vez que a retroalimentação negativa da P_4 sobre a liberação de LH ocorre em nível do hipotálamo.

Por outro lado, Cruz, Valle e Kesler (1997) e Rubianes et al. (1997) observaram que a aplicação de GnRH 30 ou 48 horas após a aplicação de $PGF_{2\alpha}$, induziu um pico de LH com maior amplitude do que quando a aplicação foi feita no início ou no meio da fase luteínica. Isto indica que, possivelmente, além do estágio de desenvolvimento folicular, as concentrações hormonais que precedem o pico de LH são importantes na determinação da resposta ovulatória.

A combinação de GnRH e $PGF_{2\alpha}$ para inseminação artificial em tempo fixo tem sido usada com bons resultados tanto em vacas de leite como em vacas de corte (RATHBONE, 2001). Esse protocolo é conhecido como *Ovsynch* e, em vacas de leite, consiste na utilização de GnRH seguida por uma aplicação de $PGF_{2\alpha}$ 7 dias mais tarde e uma segunda aplicação de GnRH 48 horas após o tratamento com $PGF_{2\alpha}$. A inseminação artificial é realizada, então, 15 horas mais tarde, sem detecção de cio (PURSLEY; KOSOROK; WILTBANK, 1997; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Em vacas de corte, protocolo similar tem sido utilizado com um intervalo de 6 dias entre a primeira aplicação de GnRH e o tratamento com $PGF_{2\alpha}$ (MARTINEZ et al., 2001).

A explicação para a efetividade desse tratamento é que a primeira aplicação de GnRH promove a ovulação ou a luteinização do maior folículo presente e a emergência de uma nova onda folicular após 2 dias. A aplicação de PGF_{2α} irá causar a lise do CL formado em consequência da aplicação da primeira dose de GnRH. A segunda aplicação de GnRH é responsável por uma melhor sincronização da ovulação do folículo dominante presente na onda folicular induzida pela primeira aplicação de GnRH (BÓ et al., 2002).

O protocolo *Ovsynch* tem mostrado melhores resultados em vacas do que em novilhas (MARTINEZ et al., 2001; PURSLEY; KOSOROK; WILTBANK, 1997). Em novilhas, Pursley, Mee e Wiltbank (1995) mostraram que a primeira aplicação de GnRH nem sempre resulta em ovulação ou luteinização do folículo dominante, tendo os autores obtido 85% de ovulações em vacas lactantes e apenas 54% em novilhas, após a primeira injeção de GnRH. A emergência de uma nova onda folicular será possível somente se o tratamento com GnRH causar ovulação ou luteinização de folículos da onda em crescimento; portanto, a ovulação provocada pela segunda aplicação de GnRH será insuficientemente sincronizada se a primeira aplicação não sincronizar a emergência de uma nova onda folicular (BÓ et al., 2002).

Além disso, algumas novilhas mostram sinais de estro antes da segunda aplicação em GnRH. A utilização de uma fonte exógena de P₄ pode prevenir essas ovulações precoces, e tem mostrado aumento significativo nas taxas de prenhez de novilhas inseminadas em tempo fixo (MARTINEZ et al., 2000).

Protocolos *Ovsynch* também têm sido utilizados para sincronizar a ovulação de receptoras de embrião. Tratando novilhas mestiças *Bos taurus x Bos indicus* com protocolo *Ovsynch*, ou com uma única dose de PGF_{2α} (grupo controle), Baruselli et al. (2000) observaram maior número de animais aptos para a inovulação e maior taxa de prenhez em novilhas submetidas ao protocolo *Ovsynch* do que nas novilhas do grupo controle. Esses resultados sugerem que taxas de prenhez aceitáveis podem ser obtidas quando embriões são

transferidos em receptoras tratadas com protocolos que sincronizam a ovulação, sem a necessidade de detecção de estro.

4.3 FORMAÇÃO DE FOLÍCULOS PERSISTENTES

Com o objetivo de estudar os fatores que determinam o número de ondas dentro de um ciclo, Sirois e Fortune (1990) colocaram CIDR[®] em novilhas do dia 14 ao dia 28 do ciclo estral. Presumia-se que a manutenção do CIDR[®] nesse período iria manter as concentrações plasmáticas de P₄, atrasar o estro e acarretar o desenvolvimento de ondas foliculares adicionais durante o ciclo prolongado artificialmente. No entanto, após a luteólise, o CIDR[®] manteve a P₄ em níveis sub-luteais, de 1,5 a 2,0 ng/ml. Na presença desses níveis, o folículo dominante da segunda ou terceira onda persistia como folículo dominante por 2 a 3 semanas. Quando as novilhas foram tratadas com 2 CIDR[®]s, níveis luteais de P₄ foram mantidos e foi observado o desenvolvimento de 4 a 5 ondas regulares, não ocorrendo, portanto, o desenvolvimento de folículos persistentes.

Sendo a concentração plasmática de P₄ importante fator regulador da frequência dos pulsos de LH, o crescimento prolongado do folículo dominante frente ao tratamento com baixas doses de P₄ foi atribuído a aumento dos pulsos de LH pela hipófise (FORTUNE; RIVERA, 1999). Sanchez et al. (1995) e Savio et al. (1993) já haviam observado que a maior secreção de LH, que ocorre na presença de baixas concentrações plasmáticas de P₄, está associada a elevadas concentrações de 17 β -estradiol e ao desenvolvimento de folículos dominantes acima do tamanho normal.

Esses folículos persistentes que se desenvolvem na presença de baixas concentrações de P₄ ovulam quando a progestina é removida, podendo, assim, induzir o estro sincronizado. Este procedimento, contudo, está associado à baixa fertilidade (HANSEL; MALVEN; BLACK, 1961, WILTBANK et al., 1965).

A fertilidade diminuída após o tratamento prolongado com progestágenos (14 dias ou mais) foi atribuída à idade do ovócito dentro de folículos de vida longa e acima do tamanho normal (CUSTER et al., 1994), uma vez que a viabilidade do ovócito nos mamíferos é curta (FISSORE et al., 2002). A maturação espontânea (ou seja, o rompimento da vesícula germinativa e a expansão do *cumulus*) foi evidente em 23/23 folículos dominantes persistentes, enquanto o mesmo ocorreu em apenas 5/29 dos folículos dominantes em crescimento normal (REVAH; BUTLER, 1996).

Por outro lado, folículos persistentes podem ser induzidos a ovular e a formar um CL funcional normal, o qual irá, aparentemente, garantir a gestação após a transferência de um embrião viável (WEHRMAN et al., 1997).

4.4 MECANISMOS DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

As interações entre o embrião e o útero são complexas e essenciais para o desenvolvimento normal do embrião e sua implantação. Acredita-se que problemas nos mecanismos sinalizadores sejam um fator importante na mortalidade embrionária, tendo em vista que um alto índice de morte embrionária ocorre nesse período. A P₄ desempenha papel fundamental na gestação que se inicia, agindo sobre o epitélio endometrial para induzir a secreção de fatores indispensáveis para o desenvolvimento normal do embrião. A sincronia

entre o embrião e o endométrio é regulada pela elevação pós-ovulatória da P_4 . É provável que tanto o momento da elevação da P_4 plasmática como sua concentração na fase lútea sejam importantes para a manutenção da prenhez (GOFF, 2002).

Uma vez que a $PGF_{2\alpha}$ secretada pelo útero é a luteolisina natural dos grandes animais domésticos, a manutenção da prenhez nesses animais é dependente de um bloqueio da produção endometrial de $PGF_{2\alpha}$.

O período entre os dias 15 e 17 do início da prenhez é considerado como um “período crítico”, uma vez que a secreção pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ que ocorre nesse período causa a luteólise, a menos que o conceito envie sinais antiluteolíticos efetivos e que o endométrio responda apropriadamente a esses sinais para bloquear a produção de $PGF_{2\alpha}$ (BINELLI et al., 2001, GOFF, 2002).

Em ovelhas, têm sido proposto que o início da luteólise depende da síntese de receptores para a ocitocina no endométrio, estimulada pela exposição do útero a adequadas concentrações de esteróides ovarianos - progesterona e estradiol (SILVIA, 1999). Dessa forma, a ligação da ocitocina, secretada pela glândula pituitária, aos seus receptores, desencadeia a secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo útero (McCRACKEN et al., 1995).

Assim como nas ovelhas, também em vacas, há formação de receptores para a ocitocina nas células epiteliais que revestem o lúmen uterino; no entanto, nestes animais, o bloqueio dos receptores de ocitocina por meio de um antagonista específico (CAP-527) não impediu a secreção pulsátil de $PGF_{2\alpha}$, nem a luteólise. Além disso, os animais tratados com CAP-527 tiveram um ciclo estral com duração semelhante àqueles do grupo controle (KOTWICA et al., 1997). Estes dados indicam que, em bovinos, a ocitocina pode não ser determinante para o início da luteólise.

Já a presença de E_2 é fundamental para que a luteólise ocorra em fêmeas bovinas, uma vez que a remoção dos folículos ovarianos por cauterização ou irradiação atrasou a luteólise e aumentou a duração do ciclo estral (VILLA-GODOY et al., 1985).

As concentrações plasmáticas de P_4 também parecem ter uma correlação positiva com o reconhecimento da gestação em vacas. Nesse contexto, Mann, Lamming e Fray (1995) analisaram diariamente as concentrações plasmáticas de P_4 em vacas leiteiras durante 30 dias após a inseminação, tendo verificado que fêmeas inseminadas e prenhes apresentavam maiores concentrações de P_4 do que aquelas inseminadas mas que não ficaram prenhes.

Vacas leiteiras de alta produção possuem menor concentração plasmática de P_4 se comparadas com vacas de baixa produção; isto se deve provavelmente ao maior catabolismo de P_4 nas vacas de alta produção. Assim, a menor concentração plasmática de P_4 pode explicar, ao menos parcialmente, a baixa fertilidade associada à alta produção de leite (VASCONCELOS, 2000).

A intensidade da resposta luteolítica pode ser avaliada pela concentração do principal metabólito da $PGF_{2\alpha}$, a PGFM. Assim, Mann e Lamming (1995) testaram a resposta luteolítica de vacas ovariectomizadas e submetidas a dois tratamentos, um que gerava níveis basais de P_4 , equivalentes à fase lútea, e outro que gerava níveis mais elevados. Verificaram que aquelas que possuíam concentrações plasmáticas de P_4 mais baixas apresentavam um sinal luteolítico mais forte, representado por maiores concentrações plasmáticas de PGFM.

Em vacas normais, a baixa concentração de P_4 resulta em alta frequência de liberação dos picos de LH, estimulando, assim, o crescimento do folículo dominante e sua produção de E_2 (ROBERTSON et al., 1989). O E_2 , por sua vez, estimula tanto o desenvolvimento de receptores para ocitocina no endométrio como a produção de $PGF_{2\alpha}$ (BEARD; LAMMING, 1994). Isto sugere que, em vacas intactas, o efeito das baixas concentrações de P_4 no processo

anti-luteolítico são mais adversos que em vacas ovariectomizadas, como encontrado no experimento de Mann e Lamming (1995) em que o E₂ foi administrado de forma constante.

O principal regulador do processo anti-luteolítico é o interferon- τ (IFN- τ), secretado pelo concepto e que, por via parácrina, bloqueia a síntese de PGF_{2 α} (BINELLI et al., 2001). De fato, infusões de IFN- τ no útero podem prolongar o ciclo estral e diminuir sensivelmente a secreção de PGF_{2 α} em resposta a uma injeção de ocitocina (MEYER et al., 1995).

Nesse contexto, um mecanismo pelo qual a P₄ pode manter a prenhez é através da estimulação da secreção de IFN- τ pelo concepto, tendo Mann et al. (1999) demonstrado que, vacas com altas concentrações plasmáticas de P₄ durante o período crítico, possuem conceptos maiores e com maior capacidade de produzir IFN- τ . Baixos níveis plasmáticos de P₄ podem influenciar o desenvolvimento embrionário, provavelmente por alterar as secreções do endométrio, resultando em baixas secreções de IFN- τ e, assim, menor capacidade para inibir a secreção de PGF_{2 α} (KERBLER et al., 1997). De fato, Mann, Lamming e Fischer (1998) recuperaram embriões aos 16 dias após a inseminação e os classificaram como bem ou mal desenvolvidos. Observaram que baixas concentrações de P₄ durante a fase luteínica, bem como a demora na elevação das suas concentrações plasmáticas, estavam relacionadas com a presença de embriões mal desenvolvidos. Este resultado sugere que um CL com maior capacidade de produzir P₄ oferece condições mais favoráveis para o desenvolvimento do concepto. Este fato já havia sido verificado por Geisert et al. (1988), que observaram que a suplementação da P₄ endógena aumenta a taxa de crescimento dos embriões e sua consequente capacidade de produzir IFN- τ .

Remsen e Roussel (1982) relataram correlação significativa entre a concentração sérica de P₄ em vacas receptoras, medida no dia da inovulação (dia 7 ou 8), e a subsequente taxa de prenhez. Observaram que, quando as concentrações de P₄ estavam abaixo de 2,0 ng/ml, as

taxas de prenhez eram de 20%, enquanto que concentrações entre 2,0 e 5,0 ng/ml estavam relacionadas com taxas de 74%.

Contudo, Payas et al. (1989) não observaram diferença estatisticamente significativa nas taxas de prenhez pós-transferência, em receptoras com maior concentração plasmática de P₄. Do mesmo modo, Hasler et al. (1980) determinaram a concentração sérica de P₄ em 528 receptoras de embrião e não encontraram diferença nos níveis hormonais entre as receptoras prenhes e as não-prenhes.

Esses dados sugerem coletivamente que a concentração plasmática de P₄ materna não deve ser considerada como fator determinante para o estabelecimento e manutenção da prenhez, porém mais propriamente como um fator que influencia sua probabilidade de êxito ou insucesso.

4.5 TRATAMENTOS DESTINADOS A AUMENTAR AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA E AS TAXAS DE PRENHEZ EM RECEPTORAS

A ocorrência de mortalidade embrionária entre os dias 8 e 16 após a inseminação artificial se aproxima de 30% (DISKIN; SREENAN, 1980). Essa alta taxa de mortalidade embrionária representa perdas econômicas significativas. Portanto, com base no melhor entendimento do mecanismo de reconhecimento materno da gestação e do processo anti-luteolítico, muitas estratégias têm sido propostas visando a manipulação do diálogo entre o concepto e a unidade materna com o objetivo de melhorar a sobrevivência embrionária no gado bovino.

Essas estratégias para favorecer o reconhecimento da gestação em vez da luteólise envolvem a manipulação da função folicular, da função do CL e da resposta luteolítica pela unidade materna.

Segundo Binelli (2000), a capacidade de produção de P_4 parece depender do tamanho do CL que, por sua vez, está relacionado positivamente com o tamanho do folículo dominante ovulatório. De fato, Baruselli et al. (2000) trataram receptoras bovinas com duas aplicações de $PGF_{2\alpha}$ ou com um protocolo *Ovsynch* para sincronização do estro e encontraram, independente do tratamento, uma correlação positiva entre a área do CL e a concentração plasmática de P_4 . Ao contrário, Battocchio et al. (1999) demonstraram que o volume do CL pode não ser um bom parâmetro para estimar sua capacidade de secretar P_4 .

Apesar dessa discrepância nos resultados, Moura et al. (2001) testaram a hipótese proposta por Binelli (2000) tratando receptoras bovinas com implante contendo norgestomet por 9 dias. No dia 0, as receptoras receberam o implante contendo norgestomet e foram designadas a receber 5 mg de valerato de estradiol e 3 mg de norgestomet IM (grupo 1), ou uma aplicação de 400 μ g de Delprostenate, um análogo da $PGF_{2\alpha}$ (grupo 2). As novilhas do grupo 2 apresentaram maior diâmetro médio do folículo dominante, resultando em CLs de maior tamanho e com maior capacidade de secretar P_4 quando comparadas com as novilhas do grupo 1. A taxa de aproveitamento também foi maior no grupo 2. Todavia, a taxa de prenhez não apresentou diferença estatística entre os grupos.

A administração de P_4 exógena durante a fase luteal, ou a indução de um CL adicional ou acessório (CLa) através da administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou de GnRH, têm sido bastante utilizadas para prevenir a mortalidade embrionária causada por concentrações plasmáticas insuficientes de P_4 (PETERS, 1996).

A administração de P_4 exógena tem mostrado resultados contraditórios. Utilizando dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (CIDR[®]) entre os dias 5 e 12 após a inseminação artificial, Robinson, Leslie e Walton (1989) obtiveram aumento de 30% nas taxas de prenhez. Já Stevenson e Mee (1991) não observaram aumento nas taxas de prenhez com a utilização desses dispositivos.

MacMillan e Thatcher. (1991) mostraram que o uso dos dispositivos CIDR[®] no momento da transferência de embriões aumentou as taxas de prenhez, provavelmente devido a aumento dos níveis séricos de P₄.

Diversos autores testaram diferentes tratamentos para a obtenção de CLa. Fonseca et al. (1999) avaliaram, em novilhas no 5º dia do ciclo estral, o efeito da administração de somatotropina bovina recombinante (rbST), de análogo de GnRH e de hCG, sobre a formação de um CLa, e verificaram que o hCG foi mais eficaz, tendo este hormônio e o GnRH induzido a formação de CLa em 80% e 54,4% dos animais tratados, respectivamente; nos animais tratados com rbST não houve formação de CLa. Resultados semelhantes foram obtidos por Price e Webb (1989), que obtiveram 83% de formação de CLa após tratamento com hCG, mas foram inferiores aos de Schmitt et al. (1996), que obtiveram 100% de formação de CLa após administração dessa gonadotrofina.

A administração de 1000 UI de hCG em três momentos diferentes: no momento da inseminação, no dia 7 ou no dia 14 após a mesma, resultou em maior percentagem de formação de CLa quando a administração de hCG foi feita no dia 7, promovendo um incremento nas taxas de prenhez (RAJAMAHENDRAN; SIANANGAMA, 1992).

Outra maneira de aumentar as concentrações plasmáticas de P₄ em receptoras é através da aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG). Em fêmeas bovinas, esta gonadotrofina tem efeito tanto de LH como de FSH. Assim, a administração de eCG no momento da emergência folicular pode aumentar a taxa de crescimento dos folículos, resultando em um folículo dominante pré-ovulatório maior e, conseqüentemente, em um CL também maior. Pode também estimular o crescimento simultâneo de múltiplos folículos, que podem ser induzidos a ovular e formar múltiplos CLs. Neste contexto, Baruselli et al. (2000) sincronizaram receptoras bovinas através da aplicação de BE e P₄ (IM) no dia da colocação do CIDR[®], e aplicaram, em um grupo delas, 800 UI de eCG 5 dias mais tarde. Verificaram que o

grupo de fêmeas tratadas com eCG apresentou maior número de ovulações, maior concentração plasmática de P_4 e maior taxa de concepção e prenhez do que o grupo que não recebeu eCG.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS, LOCAL DO EXPERIMENTO E TRATAMENTOS

Foram utilizadas 278 receptoras bovinas *Bos taurus* x *Bos indicus*, com idade entre 24 e 36 meses (figura 1). As novilhas eram mantidas em regime de pasto, com suplementação mineral e água à vontade, sendo submetidas a manejo higiênico-sanitário habitual e devidamente vacinadas.



Figura 1 – Receptoras utilizadas em uma das réplicas do experimento. Cornélio Procópio – PR, 2002

O experimento foi realizado em 4 réplicas distintas, sendo que, em cada uma delas, foram executados todos os tratamentos e os mesmos procedimentos para a análise dos dados.

Das 4 réplicas, 3 foram executadas no município de Cornélio Procópio, PR, enquanto a quarta réplica foi realizada no município de Iatararé, SP.

Em cada uma das réplicas, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos, descritos a seguir e ilustrados no esquema 1:

Grupo 1 (G1): As receptoras deste grupo (controle) receberam 2,0 mg de BE + 50 mg de P₄¹ por via intramuscular (IM) no dia da colocação do CIDR^{®2} (D0); oito dias depois (D8), o implante foi retirado e foi aplicado um análogo da PGF_{2α}, (0,53 mg de cloprostenol sódico³) IM pela manhã. No D9, foi aplicado 0,5 mg de BE⁴ IM. O D10 foi considerado como sendo o dia do estro e o D17 foi o dia da inovulação.

Grupo 2 (G2): Os animais do grupo 2 também receberam 2,0 mg de BE + 50 mg de P₄ no dia da colocação do CIDR[®] (D0). Todavia, os animais receberam 2 aplicações de PGF_{2α}, uma no início do tratamento e outra 5 dias depois, sendo abolida a aplicação de PGF_{2α}, no momento da retirada do implante. Nestes animais, o CIDR[®] foi mantido por 14 dias; assim, no D15 foi aplicado 0,5 mg de BE e o D16 foi considerado o dia do estro. O dia da inovulação foi o D23.

Grupo 3 (G3): Neste grupo, o tratamento foi semelhante ao do G2, mas a PGF_{2α} foi aplicada uma única vez, aos 5 dias após o início do tratamento.

Grupo 4 (G4): O tratamento foi semelhante ao do G2, tendo os animais recebido 2 aplicações de PGF_{2α}, uma no dia da colocação do CIDR[®] e outra no dia da retirada do implante.

¹ Index Farmaceutica

² InterAg – Hamilton, Nova Zelândia / Pharmacia Animal Health

³ Ciosin[®], Coopers Brasil Ltda

⁴ Estrogin, Farmavet Produtos Veterinários – Indústria Brasileira

O tratamento dos animais que permaneceram com o CIDR[®] por 14 dias foi iniciado 6 dias antes do tratamento dos animais que permaneceram com o CIDR[®] por 8 dias, para que a retirada do implante, assim como as avaliações ultrassonográficas e a inovulação fossem realizadas no mesmo dia em todos os animais.

5.2 ULTRASSONOGRAFIA OVARIANA E DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ

A atividade ovariana foi monitorada por ultrassonografia, utilizando-se aparelho (B-mode) munido de transdutor linear transretal de 5,0 Mhz⁵, conforme proposto por Pierson e Ginther (1988).

A avaliação ultrassonográfica foi realizada em três ocasiões. A primeira, 1 dia após a retirada do CIDR[®], e teve por objetivo determinar o diâmetro do folículo dominante. A segunda foi efetuada no dia da inovulação, cuja finalidade foi determinar a área do corpo lúteo. A terceira, 45 dias após a inovulação, para realizar o diagnóstico da prenhez.

A visualização do ovário foi obtida posicionando-se o transdutor em planos diferentes até que o maior diâmetro do folículo dominante ou a maior área do CL fossem visualizados, quando, então, a imagem era congelada na tela do aparelho para que fossem feitas as mensurações das estruturas ovarianas que, no caso do folículo dominante, era feita medindo-se o diâmetro longitudinal e o transversal, para ser obtido o diâmetro médio.

⁵ Aloka SSD 500 – Aloka Co. Ltda., Tokyo,

5.3 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

No dia da segunda avaliação ultrassonográfica, foram colhidas amostras de sangue por punção da veia caudal, em tubos de vácuo de 10 ml contendo heparina⁶. Após a colheita, as amostras permaneciam refrigeradas até que fossem centrifugadas a 2000g por 15 minutos⁷ para a separação do plasma, o que ocorria dentro de 30 minutos, em média.

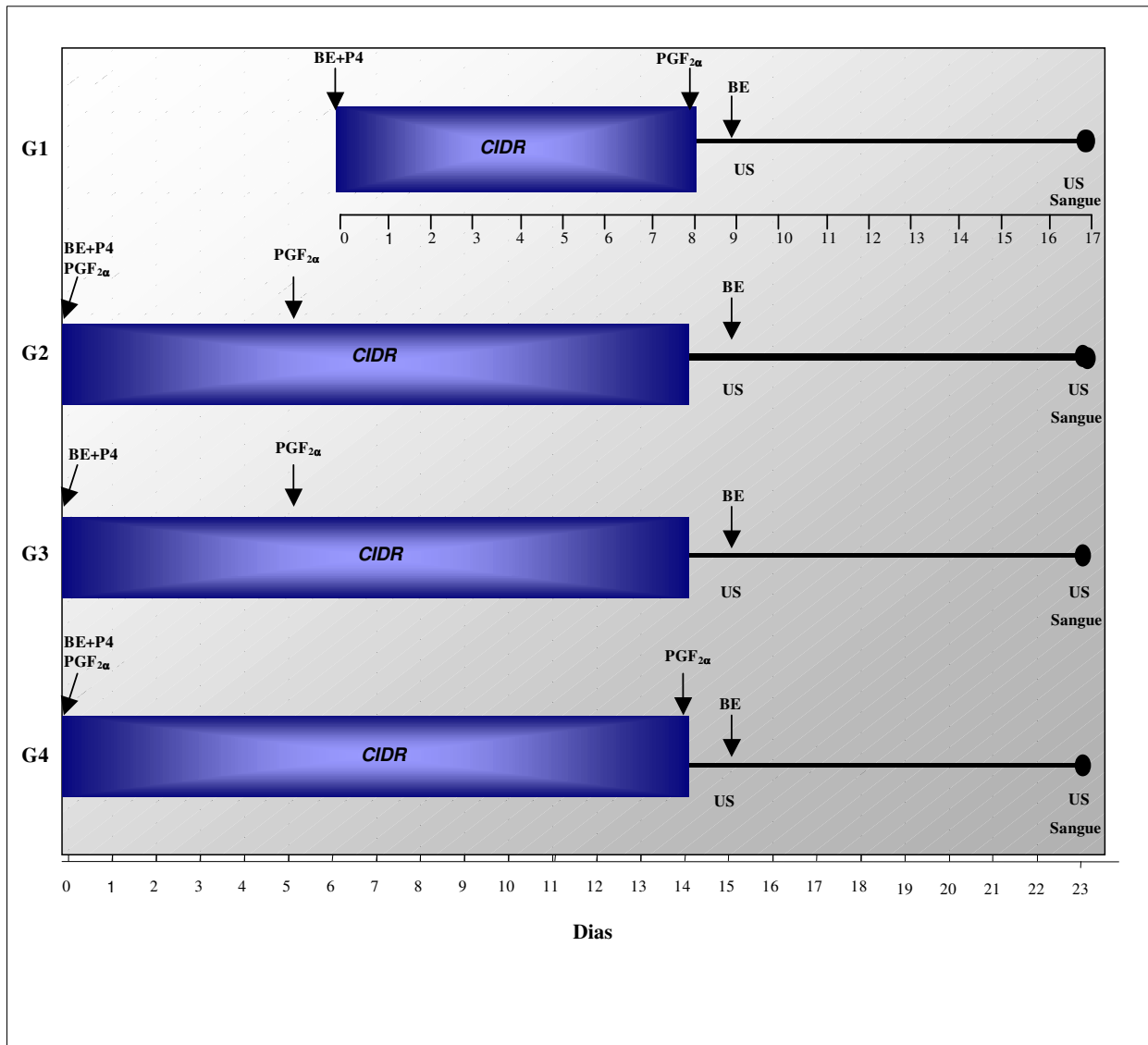
O plasma era retirado do tubo com o auxílio de pipeta, envasado em criotubo previamente identificado e armazenado a -20°C em *freezer* até o momento da realização da dosagem hormonal.

As dosagens de P_4 foram feitas utilizando-se conjuntos (*kits*) de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida⁸. As análises foram feitas em duplicata no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), tendo sido executadas de acordo com a técnica recomendada pelo fabricante. A sensibilidade ou limite de detecção do teste foi de 0,07 ng/ml, e os coeficientes de variação intra e interensaio foram inferiores a 10%.

⁶ Vacutainer, Becton Dickinson & Company, EUA

⁷ Centrífuga Excelsa Baby I, Fanem[®], São Paulo, Brasil

⁸ Progesterone Coat-A-Count[®], Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA



Esquema 1 - Diagrama esquemático do experimento

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média \pm erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

As variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (p).

As variáveis resposta diâmetro do folículo dominante um dia após a retirada do CIDR[®] e área do corpo lúteo no momento da involução obedeceram às premissas, tendo sido analisadas através do procedimento ONEWAY ANOVA.

A variável resposta concentração plasmática de P_4 não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para a raiz quadrada de seus valores.

As variáveis resposta taxa de aproveitamento, taxa de concepção e taxa de prenhez não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram, então, analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Resultados

6 RESULTADOS

O efeito dos tratamentos no diâmetro do FD, na área do CL e nas concentrações plasmáticas de P₄ está representado na tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro do FD, área do CL e concentração plasmática de P₄ (média ± erro padrão da média) em receptoras de embrião bovino tratadas com CIDR[®] por 8 dias e por 14 dias, associado com a administração de PGF_{2α} em diferentes momentos do tratamento. Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002

Grupos	N	Ø FD (mm)	Área do CL (cm ²)	Concentração plasmática de P ₄ (ng/ml)
G1 (CIDR [®] por 8 dias)	70	7,85 ± 0,36 ^b	1,96 ± 0,06 ^b	2,30 ± 0,25 ^b
G2 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D0 e D5)	71	11,11 ± 0,31 ^a	2,32 ± 0,07 ^a	3,78 ± 0,25 ^a
G3 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D5)	67	10,61 ± 0,37 ^a	2,36 ± 0,08 ^a	3,78 ± 0,30 ^a
G4 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D0 e D14)	70	10,60 ± 0,32 ^a	2,16 ± 0,07 ^{a,b}	3,12 ± 0,28 ^{a, b}

^{a, b} dentro de uma mesma coluna indicam diferença estatística nas médias (p < 0,05)

O diâmetro médio do folículo dominante 1 dia após a retirada do CIDR[®] não diferiu estatisticamente entre os grupos que permaneceram com o implante por 14 dias (G2=11,11 ± 0,31 mm; G3=10,61 ± 0,37 mm; G4=10,60 ± 0,32; p > 0,05). No entanto, os diâmetros médios dos folículos dominantes nesses grupos foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo que permaneceu com o CIDR[®] durante 8 dias (G1=7,85 ± 0,36 mm; p < 0,0001).

A figura 2 mostra imagens de ultrassom ilustrando as dimensões dos folículos dominantes de um animal de cada um dos grupos experimentais.

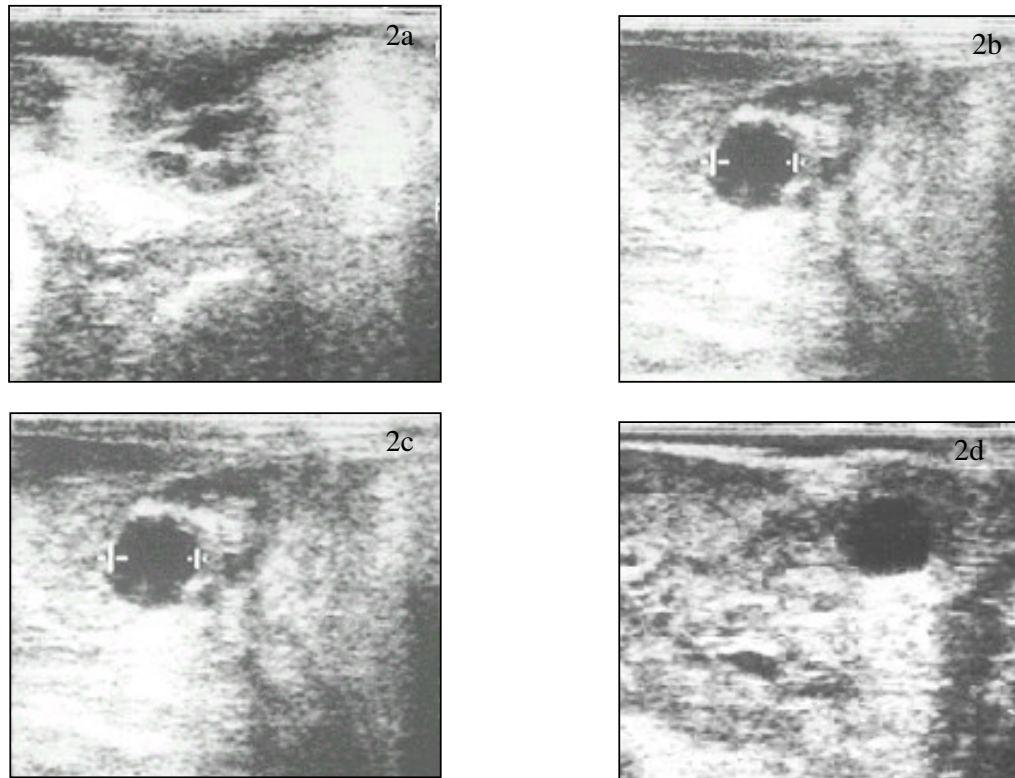


Figura 2 - Imagens ultrassonográficas ilustrando o maior diâmetro do folículo dominante nos grupos 2, 3 e 4 (figura 2b, 2c e 2d respectivamente) do que no grupo 1 (figura 2a)

A área do CL apresentou maior valor nos grupos G2 e G3 em comparação com o grupo G1 ($G1 = 1,96 \pm 0,06 \text{ cm}^2$, $G2 = 2,32 \pm 0,07 \text{ cm}^2$ e $G3 = 2,36 \pm 0,08 \text{ cm}^2$; $p < 0,005$).

O grupo G4 ($G4=2,16 \pm 0,07 \text{ cm}^2$) não diferiu estatisticamente dos demais.

A figura 3 ilustra as dimensões dos corpos lúteos de um animal de cada um dos grupos experimentais, vistos através de imagens ultrassonográficas.

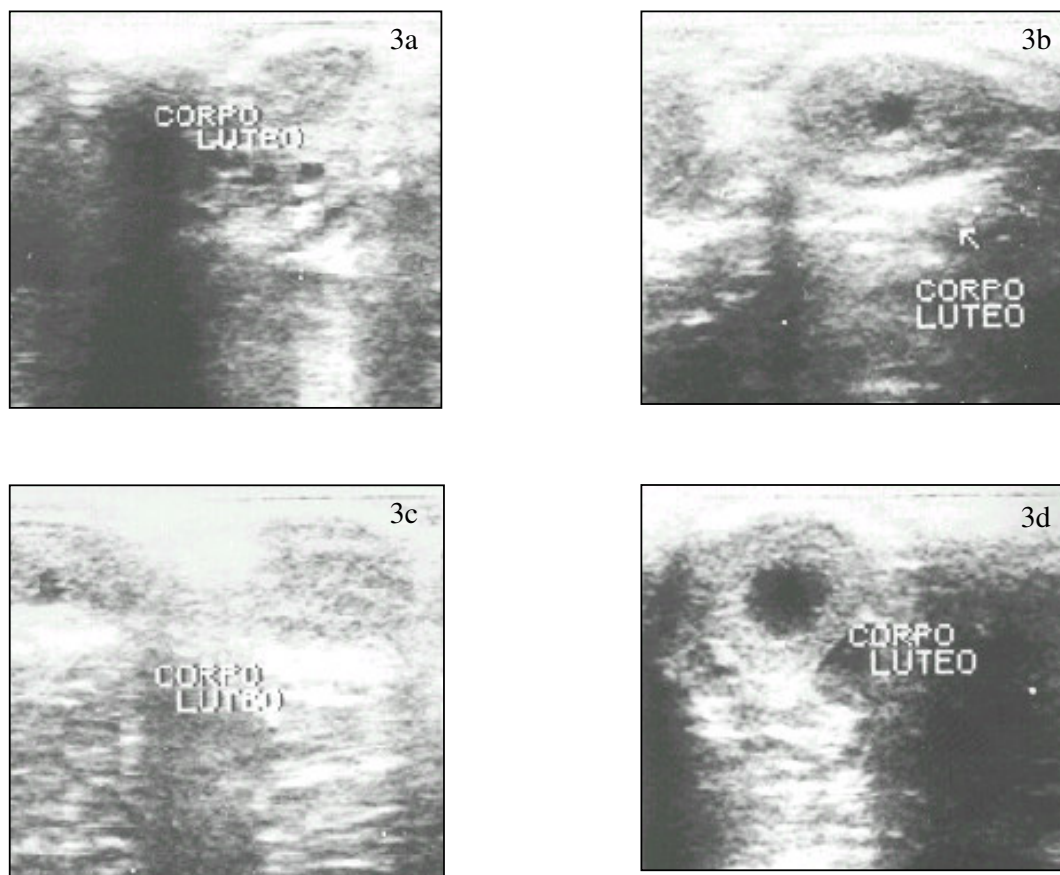


Figura 3 - Imagens ultrassonográficas de corpos lúteos obtidos nos grupos 1, 2, 3 e 4 (figuras 3a, 3b, 3c e 3d respectivamente)

As concentrações plasmáticas de P_4 no dia da involução não foram estatisticamente diferentes entre as novilhas dos grupos G2, G3 e G4 (CIDR[®] por 14 dias) ($G_2=3,78 \pm 0,25$ ng/ml, $G_3=3,78 \pm 0,30$ ng/ml e $G_4=3,12 \pm 0,28$ ng/ml; $p > 0,05$). Porém, as concentrações foram maiores nos grupos G2 e G3 que no grupo G1 ($2,30 \pm 0,25$ ng/ml; $p < 0,0001$).

A taxa de aproveitamento foi estatisticamente menor no grupo G1 quando comparado com os grupos G2 e G3 ($G_1= 51,4\%$; $G_2=77,4\%$ e $G_3=74,6\%$), enquanto o grupo G4 ($G_4=68,6\%$) não diferiu estatisticamente dos demais ($p > 0,05$).

Em relação à taxa de concepção, o grupo G1 foi estatisticamente maior que os grupos G2 e G3 (G = 59,1%, G = 38,9% e G = 37,1%), enquanto o grupo G4 não apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos (G4 = 50,0%).

A taxa de prenhez não diferiu significativamente entre os quatro grupos (G1 = 30%, G2 = 29,6%, G3 = 28,4 e G4 = 34,3%; $p > 0,05$).

A tabela 2 apresenta as taxas de aproveitamento, concepção e prenhez obtidos nos diferentes tratamentos.

Tabela 2 - Taxa de aproveitamento, concepção e prenhez em receptoras de embrião bovino tratadas com CIDR[®] por 8 dias (G1), e com CIDR[®] por 14 dias associado com a administração de PGF_{2α} em diferentes momentos do tratamento. Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002

Grupos	N	Taxa de Aproveitamento (%)	Taxa de Concepção (%)	Taxa de Prenhez (%)
G1 (CIDR [®] por 8 dias)	70	51,4 (36/70) ^b	59,1(21/36) ^a	30,0 (21/70)
G2 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D0 e D5)	71	77,4 (55/71) ^a	38,9 (21/55) ^b	29,6 (21/71)
G3 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D5)	67	74,6 (50/67) ^a	37,1 (19/50) ^b	28,4 (19/67)
G4 (CIDR [®] por 14 dias + PGF _{2α} D0 e D14)	70	68,6 (48/70) ^{a, b}	50,0(24/48) ^{a, b}	34,3 (24/70)

^{a, b} dentro de uma mesma coluna indicam diferença estatística nas médias ($p < 0,05$)

Foi observada correlação positiva entre o diâmetro do folículo dominante e a área do CL ($r = 0,35326$; $p = 0,0004$), bem como entre o diâmetro do FD e a concentração plasmática de P₄ ($r = 0,3939$; $p < 0,0001$) e entre a área do CL e a concentração plasmática de P₄ ($r = 0,43316$; $p < 0,0001$). Essas correlações estão representadas nos gráficos 1, 2 e 3 respectivamente.

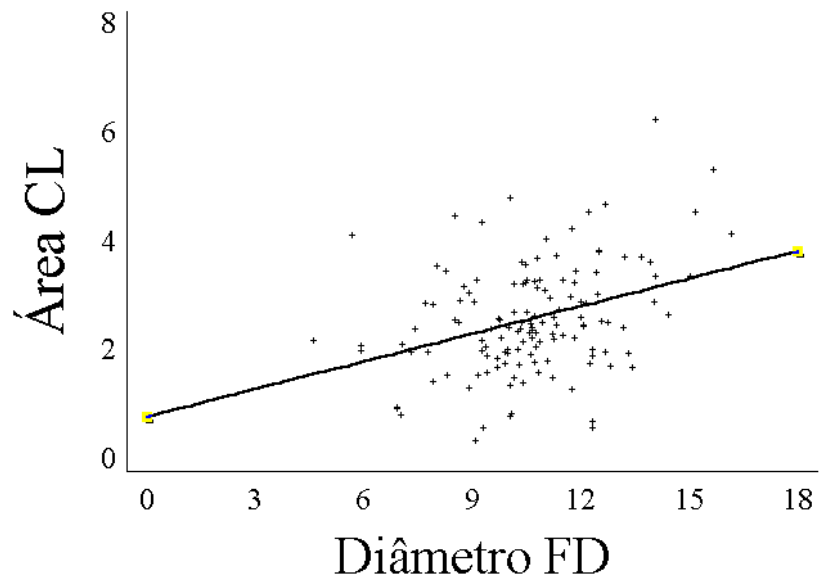


Gráfico 1- Correlação entre o diâmetro do FD (mm) um dia após a retirada do CIDR[®] e a área do CL (cm²) no momento da involução em receptoras de embrião bovino ($r = 0,35326$; $p = 0,0004$). Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002

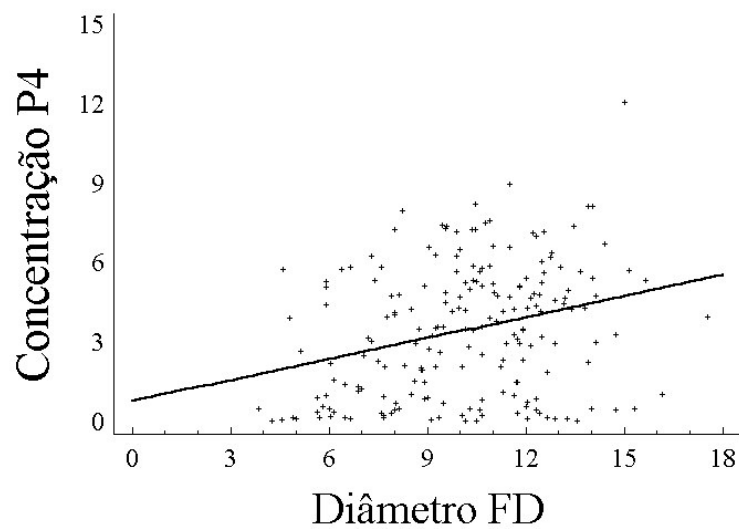


Gráfico 2 - Correlação entre o diâmetro do FD (mm) um dia após a retirada do CIDR[®] e a concentração plasmática de P₄ (ng/ml) no momento da inovulação em receptoras de embrião bovino ($r = 0,3939$; $p < 0,0001$). Cornélio Procópio – PR e Itararé – SP, 2002

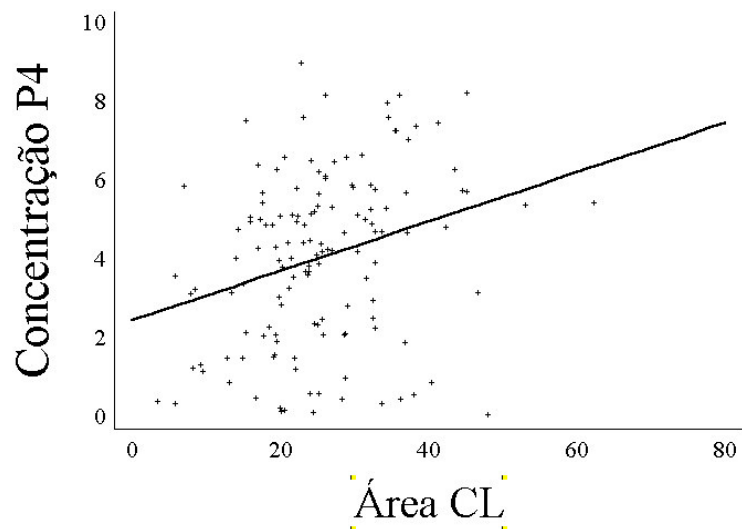


Gráfico 3 - Correlação entre a área do CL (cm^2) e a concentração plasmática de P_4 (ng/ml) no momento da involução em receptoras de embrião bovino ($r = 0,43316$; $p < 0,0001$). Cornélio Procópio – PR e Itararé - SP, 2002

Discussão

7 DISCUSSÃO

O diâmetro do folículo dominante nos grupos que permaneceram com CIDR[®] por 14 dias foi maior que no grupo tratado com CIDR[®] por 8 dias. Nesses grupos, a aplicação de PGF_{2α} no início do tratamento permitiu que os folículos se desenvolvessem em um ambiente com concentrações plasmáticas sub-luteais de progesterona, obtidas pela presença de um CIDR[®] na ausência de um CL.

Lucy, Thatcher e Macmillan (1990) e Kinder et al (1996) já haviam relatado que as concentrações plasmáticas de P₄, resultantes da administração de progestágenos em doses recomendadas para uso comercial em bovinos, quando na ausência de um CL, resulta no desenvolvimento de folículos dominantes acima do tamanho normal, que persistem por tempo prolongado.

Segundo Fortune e Rivera (1999), frequência de liberação dos pulsos de LH pela hipófise é controlada pelas concentrações plasmáticas de P₄. Dessa forma, animais tratados com doses de progestágenos que resultam em concentrações plasmáticas de P₄ similares àquelas encontradas durante a fase luteal do ciclo estral (6 a 8 ng/ml), apresentam menor frequência nos pulsos de LH quando comparados com animais tratados com doses que resultam em concentrações plasmáticas sub-luteais de P₄ (1 a 2 ng/ml).

Provavelmente, o aumento na frequência dos pulsos de LH pode ter sido responsável pelo contínuo crescimento do folículo ovulatório nos animais que receberam PGF_{2α} no início do tratamento e que permaneceram com CIDR[®] por tempo prolongado.

No grupo G4 a aplicação de PGF_{2α} foi realizada somente no início e no final do tratamento (D0 e D14) com o objetivo de abolir os transtornos e os custos gerados pelo manejo dos animais no D5. Uma vez que no metaestro o CL não apresenta responsividade à

PGF_{2α}, alguns animais desse grupo podem não ter apresentado luteólise no início do tratamento e as concentrações plasmáticas de P₄ resultantes da presença do CIDR[®] somaram-se às oriundas do CL, acarretando “*turn-over*” folicular e impossibilitando a formação de folículos persistentes. Esta possibilidade foi apresentada por Sirois e Fortune (1990) que verificaram o desenvolvimento de ondas foliculares adicionais quando mantiveram artificialmente as concentrações plasmáticas de P₄ semelhantes às encontradas em uma fase luteal normal. Estima-se que, se todas as receptoras estivessem ciclando, aproximadamente 23% delas se encontrariam na fase de metaestro e não responderiam à aplicação de PGF_{2α} no dia da colocação do CIDR[®].

A área do CL foi maior no grupo G2 e G3 que no grupo G1, no entanto o grupo G4 não apresentou diferença estatística em relação aos demais. Provavelmente, o grupo G4 não diferiu do grupo controle (G1) em relação a essa variável devido ao “*turn-over*” folicular que pode ter ocorrido em uma parte dos animais que podem não ter respondido à aplicação de PGF_{2α} no D0, fazendo com que a P₄ oriunda do CIDR[®] se somasse àquela do CL.

O mesmo ocorreu com as concentrações plasmáticas de P₄, que foram maiores nos grupos G2 e G3 em comparação com o grupo G1, enquanto o grupo G4 não apresentou diferença estatística em relação aos demais. A explicação para estes resultados é provavelmente a mesma que a referente à área do CL.

Bergfelt, Kastelic e Ginther (1991) e Sirois e Fortune (1990) relataram que os níveis de P₄ durante a fase luteal têm influência no diâmetro máximo do folículo dominante em bovinos. Os altos níveis de P₄ observados durante a permanência dos dispositivos intravaginais poderiam promover menor secreção de LH, levando ao comprometimento do desenvolvimento folicular. Essa menor taxa de crescimento provocaria a imaturidade folicular mesmo após a retirada do dispositivo. O folículo imaturo seria incapaz de induzir o pico de LH por secretar estradiol inadequadamente, ou não responderia a esse pico.

Tais eventos podem explicar a baixa taxa de ovulação e, conseqüentemente a baixa taxa de aproveitamento encontrada nos tratamentos convencionais com CIDR® por 8 dias. Baruselli, et al (2000) obtiveram taxa de aproveitamento de 34% em animais tratados com CIDR® por 7 dias associado à aplicação de PGF_{2α} no final do tratamento, mas essa taxa aumentou para 80% quando a PGF_{2α} foi aplicada do 5º dia do tratamento associada a uma aplicação de 800 UI de eCG, devido ao desenvolvimento de maior número de folículos com diâmetro maior que 0,8 cm que deram origem a um maior número de CLs por animal ou a um maior CL único quando comparado com o tratamento convencional.

A baixa taxa de ovulação encontrada nos tratamento com CIDR® por 8 dias parecem ser mais evidentes em animais *Bos indicus*. Carvalho (comunicação pessoal)¹, tratando novilhas com CIDR® por 8 dias associado a PGF_{2α} no momento da retirada do dispositivo, comparou a dinâmica folicular de três grupos raciais (Nelore vs. Nelore/Angus vs Angus), e observou que o grupo Nelore apresentou taxa de ovulação (42,0%, 5/12) estatisticamente menor ($p < 0,05$) que os grupos Nelore/Angus e Angus (84,6%, 11/13 e 75,0%, 9/12, respectivamente).

No presente experimento, a taxa de aproveitamento do grupo controle (G1) foi inferior às dos grupos G2 e G3, o que pode se explicado pela maior taxa de crescimento folicular desses grupos, como foi observado por Bergfelt, Kastelic e Ginther (1991). O mesmo pode ter ocorrido nos animais do G4 que não responderam a primeira aplicação de PGF_{2α} e que apresentaram “*turn over*“ folicular.

Uma vez que a P₄ estimula a produção de secreções endometriais necessárias para o desenvolvimento embrionário (GEISERT et al., 1992), além de controlar o desenvolvimento do mecanismo luteolítico (SILVIA et al., 1991), estimulando a produção de interferon- τ pelo concepto (MANN et al., 1999), ou inibindo a liberação de PGF_{2α} (MANN; LAMMING,

¹ CARVALHO, J. B. P. Dinâmica folicular em taurinos e zebuínos tratados com progesterona e benzoato de estradiol para sincronização da ovulação. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo. (em vias de publicação)

1995), esperava-se que os animais dos grupos G2, G3 e G4 que apresentaram CLs maiores e com maior capacidade de secretar P_4 , apresentassem taxas de concepção superiores. No entanto, estes grupos apresentaram menores taxas de concepção que o grupo G1.

Com o mesmo intuito de provocar folículos persistentes, Moura et al. (2001) trataram novilhas receptoras de embrião por 9 dias com implante auricular contendo norgestomet (Crestar®). O grupo 1 recebeu no dia da colocação do implante uma injeção de 3 mg de norgestomet e 5 mg de valerato de estradiol (VE), enquanto o grupo 2 recebeu apenas uma aplicação de $PGF_{2\alpha}$ no dia da colocação do implante. O diâmetro médio do FD um dia após a retirada do implante, foi maior no grupo 2 resultando em CLs de diâmetros aumentados que produziam concentrações superiores de P_4 . A taxa de aproveitamento também foi maior no grupo 2, no entanto, a taxa de concepção não diferiu estatisticamente entre os grupos, sendo inclusive inferior numericamente para o grupo com indução de folículos persistentes (47,0% e 39,4% para os grupos 1 e 2, respectivamente).

Wehrman et al. (1997) relataram que elevadas concentrações de 17β -estradiol durante o ciclo estral que precede a implantação embrionária, pode alterar a função uterina no ciclo subsequente, resultando em um ambiente intrauterino desfavorável que pode aumentar as perdas embrionárias e diminuir as taxas de prenhez.

Dessa maneira, as menores taxas de concepção nos grupos G2 e G3 podem ser explicadas, pelo menos parcialmente, pelas elevadas concentrações de 17β -estradiol decorrentes da presença de folículos dominantes de tamanho acima do normal, presentes por período prolongado durante o tratamento com o CIDR®.

Por outro lado, Shaham-Albalancy et al. (2001) observaram que concentrações de P_4 menores do que aquelas encontradas na fase luteal normal, resultam em aumento nas concentrações basais de PGFM, assim como aumentam a liberação de PGFM estimulada pela ocitocina no dia 15 do ciclo estral subsequente.

A taxa de concepção do grupo G4 não diferiu entre os demais grupos, provavelmente devido a alguns animais deste grupo terem apresentado “*turn-over*” folicular durante o tratamento, em função da possível presença de um CL.

A taxa de prenhez não diferiu entre os tratamentos, uma vez que, apesar das taxas de concepção nos grupos G2 e G3 terem sido menores, as taxas de aproveitamento nesses grupos foram estatisticamente superiores à taxa do grupo G1.

O diâmetro do FD um dia após a retirada do CIDR[®] apresentou correlação positiva com a área do CL no dia da inovulação, assim como a área do CL apresentou correlação positiva com a concentração plasmática de P₄, comprovando a hipótese de BINELLI (2001) de que a capacidade de produção de P₄ depende do tamanho do CL que, por sua vez, está relacionado positivamente com o tamanho do folículo dominante ovulatório.

8 CONCLUSÃO

A utilização do dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (CIDR[®]) por tempo prolongado, é eficaz para a formação de folículos persistentes quando associada à aplicação de PGF_{2α} no início do tratamento, independentemente da aplicação ser realizada no D0 e D5 (G2), somente no D5 (G3) ou, no D0 e D14 (G4).

A área do CL e a concentração plasmática de P₄ foram maiores nos grupos G2 e G3 que no grupo tratado com CIDR[®] por 8 dias (G1), no entanto o grupo G4 não diferiu estatisticamente dos demais.

Observou-se correlação positiva entre o diâmetro do FD e a área do CL, bem como entre esses parâmetros e as concentrações plasmáticas de P₄.

A taxa de aproveitamento foi maior nos grupos G2 e G3 que no grupo G1, enquanto o grupo G4 não diferiu estatisticamente dos demais. Ao contrário do esperado, as taxas de prenhez foram semelhantes entre os grupos, e nos grupos em que o tratamento visava a formação de folículos persistentes (G2 e G3), as taxas de concepção foram inferiores àquelas encontradas nos grupos com o tratamento convencional com CIDR[®] por 8 dias.

Não houve diferença estatística entre os grupos G2 e G3 para nenhuma das variáveis analisadas, demonstrando que a aplicação de PGF_{2α} somente no D5 é eficiente para que a luteólise ocorra, permitindo que a aplicação de PGF_{2α} no dia da colocação do CIDR[®] seja dispensada.

O grupo G4 também não apresentou diferença estatística para nenhuma das variáveis analisadas quando comparado com os grupos G2 e G3, demonstrando que o manuseio dos animais no 5º dia após a colocação do CIDR[®] poderia ser dispensado nesses protocolos.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

A utilização do dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (CIDR[®]) por tempo prolongado, é eficaz para a formação de folículos persistentes quando associada à aplicação de PGF_{2α} no início do tratamento, independentemente da aplicação ser realizada no D0 e D5 (G2), somente no D5 (G3) ou, no D0 e D14 (G4).

A área do CL e a concentração plasmática de P₄ foram maiores nos grupos G2 e G3 que no grupo tratado com CIDR[®] por 8 dias (G1), no entanto o grupo G4 não diferiu estatisticamente dos demais.

Observou-se correlação positiva entre o diâmetro do FD e a área do CL, bem como entre esses parâmetros e as concentrações plasmáticas de P₄.

A taxa de aproveitamento foi maior nos grupos G2 e G3 que no grupo G1, enquanto o grupo G4 não diferiu estatisticamente dos demais. Ao contrário do esperado, as taxas de prenhez foram semelhantes entre os grupos, e nos grupos em que o tratamento visava a formação de folículos persistentes (G2 e G3), as taxas de concepção foram inferiores àquelas encontradas nos grupos com o tratamento convencional com CIDR[®] por 8 dias.

Não houve diferença estatística entre os grupos G2 e G3 para nenhuma das variáveis analisadas, demonstrando que a aplicação de PGF_{2α} somente no D5 é eficiente para que a luteólise ocorra, permitindo que a aplicação de PGF_{2α} no dia da colocação do CIDR[®] seja dispensada.

O grupo G4 também não apresentou diferença estatística para nenhuma das variáveis analisadas quando comparado com os grupos G2 e G3, demonstrando que o manuseio dos animais no 5º dia após a colocação do CIDR[®] poderia ser dispensado nesses protocolos.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267-275, 1993.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “ovsynch” com inovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 216, 2000. Suplemento. Apresentado à XV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões

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

BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A.; VERONESI, M. C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentrations in dairy cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BEARD, A. P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of the oxytocin receptor and oxytocin-induced prostaglandin $F_{2\alpha}$ release in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 469-475, 1994.

BECK, T. W.; SMITH, V. G.; SEGUIN, B. E.; CONVEY, E. M. Bovine serum LH, GH and prolactin following chronic implantation of ovarian steroids and subsequent ovariectomy. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 2, p. 461 - 468, 1976.

BERGFELD, E. G.; KOJIMA, F. N.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITOK, R.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -estradiol in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 257 - 265, 1995.

- BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in nonbred progesterone-treated heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 24, p.193-204, 1991.
- BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 895-907, 1994.
- BERGMANN, J. A. G.; PENNA, V. M. O impacto de novas biotecnologias em programas de melhoramento animal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 110-132, 1999. Suplemento (Apresentado à XV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões).
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes. 2000, São Paulo. **Anais...** p. 99–114.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.
- BÓ, G. A. Sincronización de celos para programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes. 2000, São Paulo. **Anais...** p. 35–60.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRÍBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

- BROGLIATTI, G. M.; SALAMONE, D. F.; ADAMS, G. P. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. **Theriogenology**, v. 47, p. 1253-1264, 1997.
- BULMAN, D.C.; LAMMING, G.E. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and influencing acyclicity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 447-458, 1978.
- CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beefcows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v 49, p. 341, 1998.
- CEPEA. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. Disponível em: < <http://www.cepea.esalq.usp.br> >. Acesso em: 20 maio 2003.
- CLARKE, I. J. The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 1989.
- CNA. **Confederação Nacional da Agricultura**. Disponível em: < <http://www.cna.org.br> > Acesso em: 20 maio 2003.
- CRUZ, L. C.; VALLE, E. R.; KESLER, D. J. Effect of prostaglandin and gonadotrofin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 2, p. 135-142, 1997.
- CUPP, A. S.; STUMPF, T. T.; KOJIMA, N.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; ROBERSON, M. S.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrus cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -estradiol, **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 109-119, 1995.
- CUSTER, E. E.; BEAL, W. E.; WILSON, S. J.; MEADOWS, A. W.; BERARDINELLI, J. G.; ADAIR, R. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol 17- β and progesterone , and LH release during na artificially lengthened bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1282-1289, 1994.
- DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

- 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.
- FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. A importância da correta avaliação do patrimônio genético antes da transferência de embriões. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 101-109, 1999. Suplemento. Apresentado à XIV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.
- FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.
- FISSORE, R. A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMITH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v. 124, p. 745-754, 2002.
- FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S.; ALVIN, M. T. T.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W. S. Efeito da administração de diferentes hormônios sobre a formação de corpo lúteo acessório em novilhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 330-332, 1999.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M. Folículo dominante persistente em bovinos: aspectos básicos e aplicados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 22-34, 1999. Suplemento. Apresentado à XIV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.
- GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, p. 301-305, 1992.
- GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G.; GARRET, J. E.; WETTEMANN, R. P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, p. 11-25, 1988.
- GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 133-139, 2002.

HANSEL, W.; MALVEN, P. V.; BLACK, D. L. Estrous cycle regulation in the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 621, 1961.

HASLER, J. F.; BOWEN, R. A.; NELSON, L. D.; SEIDEL JR, G.E. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, n. 1, p. 72-77, 1980.

HENRICKS, D. M.; DICKEY, J. F.; NISWENDER, G. D. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Biology of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 346-351, 1970.

HOBSON, W. C.; HANSEL, W. Plasma LH levels after ovariectomy, corpus luteum removal and estradiol administration in cattle. **Endocrinology**, v. 91, n. 1, p. 185 - 190, 1972.

IMAKAWA, K. M.; DAY, L.; ZALESKY, D. D.; GARCIA-WINDER, M.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Regulation of pulsatile LH secretion by ovarian steroids in the heifer, **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 1, p. 162 - 168, 1986.

KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. **Animal Reproduction Science**, v. 26, p. 13-24, 1991.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990.

KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 703-714, 1997.

KESNER, J. S.; PADMANABHAN, V.; CONVEY, E. M. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 571-578, 1982.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1424-1440, 1996.

KÓ, J. C. H.; KASTELIC, J. P.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 511-519, 1991.

KOJIMA, N.; STUMPF, T. T.; CUPP, A. S.; WERTH, L. A.; ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Progestins and exogenous progesterone do not mimic the corpus luteum in regulation in LH and 17 estradiol in circulation of cows. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 6, p. 1009 - 1017, 1992.

KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; BOGACHI, M.; MELIN, P.; STROSTKA, B.; The use of na oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 1287-1299, 1997

KUZAN, F. B.; SEIDEL, G. E. Embryo transfer in animals. In: GWATKIN, R. B. L. (Ed.). **Developmental biology. Manipulation of Mammalian Development**. Plenum Press, london, p.249-278, 1986.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LUCY, M. C.; THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L. Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle given intravaginal progesterone for 15 days. **Theriogenology**, v.34, p. 325, 1990.

MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 883-889, 1991.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition on development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, n. 1, p. 1-5, 1995.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; FISHER, P. A. Progesterone control of interferon production during early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, 1998.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; FRAY, M. D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 121-131, 1995.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C. The regulation of interferon-tau production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328, 1999.

- MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; ADAMS, G. P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 24-51, 2000. Suplemento. Apresentado à XV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.
- MAPLETOFT, R. J.; MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J.; BURNLEY, C. A. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet implanted cattle. **Theriogenology**, v. 51, p. 411, 1999.
- MARTINEZ, M. F., BERGFELT, D. R., ADAMS, G. P., KASTELIC, J. P., MAPLETOFT, R. J. Synchronization of follicular wave emergence and its use in an estrus synchronization program. **Theriogenology**, v. 47, p. 145, 1997.
- MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; COOK, R. B.; OLSON, W. O.; MAPLETOFT, R. J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1049 – 1059, 2001.
- MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. The use of CIDR-B devices in GnRH/LH based artificial insemination programs. **Theriogenology**, v. 53, p. 202, 2000.
- MCCRACKEN, J. A. Prostaglandins and luteal regression – a review. **Prostaglandins**, v. 1, p. 1-4, 1972.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C.; ROBINSON, A. G. The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for luteolysis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 395, p. 133-154, 1995.
- MEYER, M. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R. M.; LI, J.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Extension of corpus luteum life span and reduction of uterine secretion of prostaglandin F₂ α of cows in response to recombinant interferon-tau. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1921-1931, 1995.
- MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 155-166, 2002.
- MIHM, M.; CROWE, M.A.; KNIGHT, P.G.; AUSTIN, E.J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 191-200, 2002.
- MOMONT, H. W.; SEGUIN, B. E. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF₂ α products: Implication for AI programs for dairy cattle. In: International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10., 1984, Illinois. **Proceedings...** Illinois: University of Illinois, v. 3, p. 336.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, p. 408, 2001.

MOURA, M. T.; MARQUES, M. O.; FRARE, J.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Sincronização da ovulação com Crestar e CIDR para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 4., 2001, Córdoba. **Anais...** p. 269.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 817-830, 1990.

OIE. **Organização Internacional de Epizootias**. Disponível em: < <http://www.oie.int> >. Acesso em: 20 maio 2003.

PAYAS, A. J.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; CHRISTIE, W. B. Factors affecting pregnancy rate in embryo transfer recipients with reference to plasma progesterone. **Theriogenology**, v. 31, n. 1 p. 238, 1989.

PETERS, A. R Embryo mortality in the cow. **Anim. Breed. Abstr.**, v. 64, n. 8, p. 587-598, 1996.

PETERS, K. E.; BERGFELD, E. G.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; GROTTJAN, H. E.; HAMERNIK, D. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers, **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1248 - 1254, 1994.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21-37, 1988.

PRICE, C.A.; WEEB, R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 303-308, 1989.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

RAJAMAHENDRAN, R.; SIANANGAMA, P. C. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 577-584, 1992.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 277-320, 2001.

REMSEN, L. G.; ROUSSEL, J. D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, v. 18, n. 3, p. 365-372, 1982.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 39-47, 1996.

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

ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 202-207, 1989.

RUBIANES, E.; BEARD, A.; DIERSCHKE, D. J.; BARTLEWSKI, P.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 48, p. 1093 – 1104, 1997.

SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; BERGFELD, E. G.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17 β -estradiol in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 464, 1995.

SAS. **The Statistical Analyse Systems for Windows V8**. Cary, 1999 – 2001.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 77-84, 1993.

SCHALLENBERGER, E.; PETERSON, A. J. Effect of ovariectomy on tonic gonadotropin secretion in cyclic and post-partum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, n. 1, p. 47 - 52, 1982.

SCHMITT, E. J. P.; BARROS, C. M.; FIELDS, P. A.; FIELDS, M. J.; DIAZ, T.; KLUGE, J. M.; THATCHER, W. W. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1915-1929, 1996.

SHAHAM-ALBALANCY, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROSENBERG, M.; WOLFENSON, D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF₂ secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 643-648, 2001.

SILVIA, W. J. The role of uterine and ovarian hormones in luteolysis: a comparison among species. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 34, p. 317-328, 1999.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 655-663, 1991.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Lengthening the bovine estrous cycle with low level of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-925, 1990.

STEVENSON, J. S.; MEE, M. O. Pregnancy rates of Holstein cows postinsemination treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3849-3856, 1991.

STUMPF, T. T.; WOLFE, M. W.; DAY, M. L.; STOTTS, J. A.; WOLFE, P. L.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Effect of 17β-estradiol on the preovulatory surge of LH in the bovine female, **Theriogenology**, v. 36, n. 2, p. 201-207, 1991.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, v. 4, p. 314-316, 1998.

TRÍBULO, H.; BÓ, G. A.; GATTI, G.; TEGLI, J. C.; CUTAIA, L.; MORENO, M.; BRITO, M.; TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. In: International Congress On Animal Reproduction (ICAR), 14., 2000. Stockholm, Sweden, **Proceedings...**

VASCONCELOS, J. L. M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes. 2000, São Paulo. **Anais...** p. 115-157.

VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; HUGHES, T. L.; FOGWEL, R. L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 60, p. 519-527, 1985.

WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E.; MELVIN, E. J.; KOJIMA, F. N. KINDER, J. E. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17 estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1413-1421, 1997.

WILTBANK, M. C. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Theriogenology**, p. 83-97, 1997.

WILTBANK, M. C.; SHIAO, T. F.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Prostaglandin receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 74-78, 1995.

WILTBANK, J. N.; ZIMMERMAN, D. R.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Use of progestacional compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **Journal of Animal Science**, v. 24, p. 990-994, 1965.