

EVERTON LUIZ REIS

**Efeito da dose e do momento da administração de  
gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no protocolo  
de sincronização da ovulação para transferência de  
embriões em tempo fixo**

São Paulo

2004

EVERTON LUIZ REIS

**Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina  
coriônica eqüina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação  
para transferência de embriões em tempo fixo**

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:**

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2004

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. 1438  
FMVZ

Reis, Everton Luiz

Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo / Everton Luiz Reis. – São Paulo : E. L. Reis, 2004.  
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

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

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Transferência de embriões. 2. Hormônios progestacionais.  
3. Gonadotropina. 4. Sincronização do cio. 5. Aborto. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

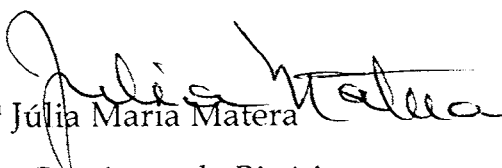
*PARECER*

Interessado: Everton Luiz Reis

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 434/2004, intitulado: "Efeito da dose e do momento de administração de eCG em receptoras de embrião bovino *Bos Taurus* x *Bos Indicus* tratadas com progesterona para transferência de embriões em tempo fixo", no qual foram utilizados 600 bovinos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 30 de julho de 2004

  
Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: REIS, Everton Luiz

Título: Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo

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: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*“A morte do homem começa no instante  
em que ele desiste de aprender”*

Albino Teixeira

*“O mais importante da vida não é a  
situação em que estamos, mas a direção  
para a qual nos movemos”*

Oliver Wendell Holmes

## **Dedicatória**

*Aos meus pais Vander e Clarice.*

*Pelo amor, apoio incondicional, lições de vida, sensatez, cooperação e amizade.*

*Agradeço vocês para o resto da minha existência pelo exemplo de como se viver com dignidade e por proporcionar condições para eu realizar meus sonhos.*

**AMO VOCÊS!!!**

## **AGRADEÇO**

Ao meu grande amor ALINE (LI), pelo companheirismo, dedicação, palavras, pelas cobranças nos momentos em que foram necessárias e por ter entrado na minha vida e a transformado. TE AMO!!!

Às duas pessoas por quem daria minha vida se fosse preciso, meus irmãos LEANDRO e DANIELLE, pela segurança que me proporcionaram em todos os momentos de indecisão. NUNCA DEIXAREI DE AMAR VOCÊS!!!

Aos meus avós maternos HERMELINDA e ANTONIO NORDI, que me amam apesar de, às vezes, não compreendê-los bem. AMO VOCÊS!!!

Aos meus avós paternos ATAMIR e IVONE REIS, que me deixaram momentos antes do início desse trabalho. SAUDADES!!!

Ao PROF. DR. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI pelo exemplo científico e de trabalho, pela informalidade de um relacionamento entre orientado e orientador e, principalmente, pela amizade nascida.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal (VRA) pelos ensinamentos e dedicação, em especial ao PROF. DR. RENATO CAMPANARUT BARNABE pela sinceridade e carisma, e aos PROF. DR. MARIO BINELLI e ED HOFFMANN MADUREIRA pelas discussões e ensinamentos científicos.

À ÉRIKA FELIPPE do LDH pela paciência e realização das dosagens de progesterona.

À bibliotecária ELZA FAQUIM pelas orientações para confecção desse trabalho dentro das instruções normativas.

A todos os funcionários do VRA pelo apoio e eficiência, sem vocês a pesquisa não seria possível, em especial à DONA SILVIA pelo Bom Dia! sempre sereno e acolhedor que recebemos quando chegamos cedo e mal humorados ao VRA.

Às secretárias HARUMI SHIRAISHI, THAÍS SOTO e MARIA ALICE MACHADO, pela eficiência, paciência e orientação.

A todos os veterinários de campo com quem passei desde de 1997, tenho certeza que aprendi um pouco com cada um, em especial ao RODRIGO e a PAULA, pessoas maravilhosas que melhoram a vida de qualquer um que tenha contato com eles.

Aos médicos veterinários e amigos LUIZ NASSER e JOSÉ ANTÔNIO MENEGATHI, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Aos quase irmãos de Nipoã GUSTAVO, JOÃOZINHO e FLÁVIO, e de São Paulo CURURU, pelo companheirismo em horas boas e ruins, e por terem me proporcionado descobrir o que é a amizade verdadeira.



A todos os colegas de departamento, em especial aos amigos NELCIO, MÁRCIO, MARCÍLIO, MANOEL, LINDSAY, ANA PAULA, TORRES e CLAUDINEY, amigos que se fizeram sempre presentes, mesmo em horas em que nada parecia dar certo.

Novamente ao MÁRCILIO, não somente pela realização da análise estatística como todos agradecem, mas por me ensinar estatística.

Aos amigos da sexagésima terceira turma HONDA, CIPÓ, LOYD, GARIBAS, SNARF, XEILA, BIVS, XIBOCA, MAZURKA, BRAHMA, XINEIS, SPETO, FULÔ, PAULINHA, nunca vou esquecer os cinco anos que passamos juntos.

À FAZENDA SONHO REAL, em especial ao MED. VET. MÁRCIO OLIVEIRA, por ter aberto as portas para a realização desse experimento.

À TECNOPEC, pelo financiamento parcial desse projeto.

A todas as empresas que trabalham em conjunto com nosso grupo de pesquisa, sem elas não seria possível produzir.

A todas as agências de pesquisa que financiam ou financiaram parte dos nossos trabalhos.

Enfim, a todos aqueles que convivi e que pude tirar palavras e ensinamentos proveitosos. Peço desculpas se esqueci algum nome, tenham certeza que o que importa é a gratidão presente dentro de cada um e não a simples escrita de um nome.

***OBRIGADO A TODOS!***

## RESUMO

REIS, E. L. **Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo.** [Effect of dose and moment of equine chorionic gonadotrophin (eCG) administration in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time embryo transfer]. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Este estudo avaliou os efeitos da administração de diferentes doses de eCG em dois momentos distintos no protocolo de sincronização da ovulação para inováção em tempo fixo. No dia 0, as receptoras foram tratadas com dispositivo intravaginal contendo progesterona (DIP) e 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE) associados a 50 mg de progesterona (P4) IM. A partir desse momento, os animais foram divididos homogeneamente para receberem 0,15 mg de d-cloprostenol ( $PGF_{2\alpha}$ ) e 400, 500 ou 600 UI de eCG no dia 5 (G-400d5, n=101; G-500d5, n=98; G-600d5, n=100, respectivamente) ou no dia 8 (G-400d8, n=100; G-500d8, n=99; G-600d8, n=96, respectivamente; fatorial 3x2). O DIP foi retirado no dia 8 e foi administrado 1 mg de BE no dia 9. No dia 17 os animais foram submetidos a ultra-sonografia ovariana e os que apresentaram mais que um corpo lúteo (CL) ou CL único maior que 18 mm de diâmetro receberam um embrião produzido *in vitro*. Em um grupo de animais, colheu-se amostras de sangue no dia 17 para determinação da concentração plasmática de P4 (CPP4). Os animais tratados com eCG no dia 5 apresentaram maior taxa de aproveitamento [87,0 (260/299) vs. 81,7% (241/295),  $P<0,05$ ], tendência de maior taxa de concepção [51,8 (132/255) vs. 45,0% (108/295),  $P=0,07$ ], maior taxa de prenhez [44,1 (132/299) vs. 36,6% (108/295),  $P<0,05$ ], maior número de CL ( $1,74 \pm 0,09$  vs.  $1,13 \pm 0,03$ ,  $P<0,05$ ) e maior proporção de receptoras com CL único de maior tamanho [CL 22: 65,7 (111/169) vs. 43,1% (94/218),  $P<0,05$ ] que os tratados no dia 8. Não se observou efeito de dose sobre a taxa de aproveitamento [400: 82,1 (165/201) vs. 500: 83,8 (165/197) vs. 600: 87,2% (171/196),  $P>0,05$ ], de concepção [400: 51,8 (85/164) vs. 500: 44,1 (71/161) vs. 600: 49,4% (84/170),  $P>0,05$ ], de prenhez [400: 42,3 (85/201) vs. 500: 36,0 (71/197) vs. 600: 42,9% (84/196),  $P>0,05$ ] e sobre a quantidade de receptoras com CL único de maior tamanho [400: 46,8 (65/139) vs. 500: 54,9 (73/133) vs. 600: 57,4 (66/115),  $P>0,05$ ]. Os animais tratados com 600 UI de eCG apresentaram maior número de CL que os que receberam 400

ou 500 UI (400:  $1,17 \pm 0,03$  vs. 500:  $1,33 \pm 0,06$  vs. 600:  $1,82 \pm 0,12$ ,  $P < 0,05$ ). No grupo que se determinou a CPP4 verificou-se que os animais que receberam eCG no dia 5 apresentaram maiores CPP4 que os do dia 8 ( $4,68 \pm 0,43$  vs.  $2,73 \pm 0,17$  ng/ml,  $P < 0,05$ ). As novilhas tratadas com 600 UI de eCG apresentaram maiores CPP que as tratadas com 400 ou 500 UI (400:  $2,96 \pm 0,22$  vs. 500:  $3,45 \pm 0,38$  vs. 600:  $4,69 \pm 0,55$ ,  $P < 0,05$ ). Receptoras com mais de 1 CL apresentaram tendência de menores perdas gestacionais entre 30 e 60 dias de gestação que as com CL único [10,2 (4/49) vs. 17,5% (33/189),  $P = 0,0547$ ]. Os resultados são indicativos de maior eficiência do protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo com o uso de eCG no dia 5. A dose de eCG não influenciou na eficiência do tratamento.

Palavras-chave: Transferência de embriões. Hormônios progestacionais. Gonadotropina. Sincronização do cio. Aborto.

## ABSTRACT

REIS, E. L. Effect of dose and moment of equine chorionic gonadotrophin (eCG) administration in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time embryo transfer. [**Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo**]. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The aim of this study was to compare the effects of different doses of eCG administered at two moments in a fixed-time embryo transfer protocol. On day 0, the heifers received a progesterone releasing vaginal insert (PRVI) and an injection of 2.0 mg Estradiol Benzoate (EB) associated with 50 mg progesterone (P4) i.m. The animals were randomly assigned to six treatment groups in a tree by two factorial design to receive 0.15 mg d-cloprostenol (PGF<sub>2α</sub>) i.m. and 400, 500 or 600 IU eCG on day 5 (G-400d5, n=101; G-500d5, n=98; G-600d5, n=100, respectively) or on day 8 (G-400d8, n=100; G-500d8, n=99; G-600d8, n=96, respectively). On day 8, the PRVI was removed and an injection of 1 mg EB was administered on day 9. On Day 17, all heifers were examined by ultrasonography to determine the number of CL and those with more than one CL or a single CL with a diameter  $\geq 18$  mm received an *in vitro* produced embryo. A subset of heifers were bled on day 17 for plasma P4 determination. The animals treated with eCG on day 5 presented higher proportion of heifers selected/treated [87.0 (260/299) vs. 81.7% (241/295), P<0.05], tendency to higher proportion of heifers pregnant/transferred [51.8 (132/255) vs. 45.0% (108/295), P<0.1], higher proportion of heifers pregnant/treated [44.1 (132/299) vs. 36.6% (108/295), P<0.05], higher CL number ( $1.74 \pm 0.09$  vs.  $1.13 \pm 0.03$ , P<0.05) and higher proportion of recipients with larger single CL [CL 22: 65.7 (111/169) vs. 43.1% (94/218), P<0.05] than those treated with eCG on day 8. Dose effects were not observed in the proportion of heifers selected/treated [400: 82.1 (165/201) vs. 500: 83.8 (165/197) vs. 600: 87.2% (171/196), P>0.05], pregnant/transferred [400: 51.8 (85/164) vs. 500: 44.1 (71/161) vs. 600: 49.4% (84/170), P>0.05], pregnant/treated [400: 42.3 (85/201) vs. 500: 36.0 (71/197) vs. 600: 42.9% (84/196), P>0.05] and proportion of recipients with larger single CL [400: 46.8 (65/139) vs. 500: 54.9 (73/133) vs. 600: 57.4 (66/115), P>0.05]. The animals that received 600 IU eCG

presented higher CL number than those received 400 and 500 IU (400:  $1.17 \pm 0.03$  vs. 500:  $1.33 \pm 0.06$  vs. 600:  $1.82 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ). In a subset of heifers that was performed a plasma P4 determination, the group that received eCG on day 5 presented higher plasmatic P4 concentration than those received eCG on day 8 ( $4.68 \pm 0.43$  vs.  $2.73 \pm 0.17$  ng/ml,  $P < 0.05$ ). The use of 600 IU eCG presented higher plasmatic P4 concentration than 500 and 600 IU (400:  $2.96 \pm 0.22$  vs. 500:  $3.45 \pm 0.38$  vs. 600:  $4.69 \pm 0.55$ ,  $P < 0.05$ ). Recipients with more than 1 CL tended to present lower pregnancy losses between 30 and 60 days than those with a single CL [10.2 (4/49) vs. 17.5% (33/189),  $P = 0.0547$ ]. The results suggest higher efficiency in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time embryo transfer with eCG administration on day 5. The dose of eCG did not affect the efficiency of treatment.

Key words: Embryo transfer. Progesterone. Gonadotrophin. Synchronization of estrus. Pregnancy loss.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Novilhas receptoras de embrião utilizadas no experimento. Terenos – MS, 2003 ..... 59
- Figura 2 - Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados nas receptoras para transferência de embriões em tempo fixo ..... 63
- Figura 3 - Embriões utilizados no experimento. Terenos – MS, 2003 ..... 64
- Figura 4 - Imagens ultra-sonográficas, no dia da inovulação, ilustrando ovários superestimulados sem ocorrência de ovulações (A e B) e superovulados (C e D) ..... 69

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Frequência dos animais de acordo com a classificação de CL único e com o dia de administração de eCG. Terenos – MS, 2003 (colunas na mesma classificação com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística,  $P < 0,05$ ) ..... 71
- Gráfico 2 - Frequência dos animais com a classificação de CL único e com a dose de eCG administrada. Terenos – MS, 2003 (colunas na mesma classificação com letras sobrescritas diferentes denotam diferença estatística,  $P < 0,05$ ) ..... 72
- Gráfico 3 - Efeito da ovulação única e da superovulação em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003 (colunas com letras sobrescritas diferentes,  $P = 0,0547$ ) ..... 74
- Gráfico 4 - Efeito do número de CL em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003 (colunas com letras sobrescritas diferentes,  $P = 0,0976$ ) ..... 75
- Gráfico 5 - Efeito da concentração plasmática de P4 no dia da inovulação em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003 ..... 75

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Grupos experimentais do presente experimento de acordo com a dose e com o momento de administração de eCG. Terenos – MS, 2003 ..... 61
- Tabela 2 - Taxa de aproveitamento, de concepção, de prenhez e número de CL em receptoras de embrião bovino tratadas com dispositivo intravaginal contendo P4 associado a 2 mg de BE e 50 mg de P4 no dia 0, PGF<sub>2α</sub> e eCG no dia 5 ou 8, 1 mg de BE no dia 9 e inovuladas dia 17. Terenos – MS, 2003 ..... 67
- Tabela 3 - Número de CL e concentração plasmática de P4 em receptoras de embrião bovino tratadas com dispositivo intravaginal contendo P4 associado a 2 mg de BE e 50 mg de P4 no dia 0, PGF<sub>2α</sub> e eCG no dia 5 ou 8, 1 mg de BE no dia 9 e inovuladas dia 17. Terenos – MS, 2003 ..... 70
- Tabela 4 - Porcentagem de superovulação e frequência dos animais de acordo com o número de CL em cada grupo experimental. Terenos – MS, 2003 ..... 73



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1	CICLO ESTRAL .....	20
2.2	CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES .....	26
2.2.1	Tratamento com Prostaglandina $F_{2\alpha}$ para Sincronização do Estro ...	26
2.2.2	Controle da Dinâmica Folicular para Realização da Transferência de Embriões em Tempo Fixo .....	28
<b>2.2.2.1</b>	<b>Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Mecânicos</b> .....	28
<b>2.2.2.2</b>	<b>Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Farmacológicos – Estrógenos Associados a Progesterona</b> .....	29
<b>2.2.2.3</b>	<b>Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Farmacológicos - Ovulação do Folículo Dominante</b> .....	32
<b>2.2.2.4</b>	<b>Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Prostaglandina <math>F_{2\alpha}</math></b> .....	33
<b>2.2.2.5</b>	<b>Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Progesterona / Progestágenos</b> .....	33
<b>2.2.2.6</b>	<b>Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Efeito Luteolítico do Tratamento com Estradiol</b> .....	34
<b>2.2.2.7</b>	<b>Indução Sincronizada da Ovulação</b> .....	35
2.3	PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA TETF .....	36
2.3.1	GnRH/PGF $_{2\alpha}$ /GnRH – “Ovsynch” .....	36
2.3.2	Progesterona, Benzoato de Estradiol e PGF $_{2\alpha}$ .....	39
2.4	USO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLOS DE TETF .....	45
2.5	MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E FETAL .....	52
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE DO TRABALHO</b> .....	56
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	57
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
5.1	ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO .....	58
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	59
5.3	TRATAMENTOS .....	60

5.4	EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS .....	61
5.5	COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA .....	62
5.6	PRODUÇÃO DOS EMBRIÕES .....	64
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	64
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em publicação datada de agosto de 2004, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) relata que a balança comercial do agronegócio brasileiro registrou saldo recorde de US\$ 19,44 bilhões nos sete primeiros meses de 2004, resultado 44,0% superior em relação ao apresentado no mesmo período de 2003 (US\$ 13,49 bilhões). As receitas de exportação cresceram 37,2% no período, alcançando a cifra de US\$ 22,24 bilhões. Assim, a participação das exportações do agronegócio no total das exportações brasileiras passou de 41,5% para 42,5%. Merece destaque o desempenho das exportações do complexo de carnes no período. As receitas do setor alcançaram US\$ 3,31 bilhões, o que representa um aumento de 59,5% sobre o valor exportado no mesmo período do ano anterior, de US\$ 2,07 bilhões. As exportações de carne bovina aumentaram 69,9%, alcançando US\$ 1,33 bilhão, contra US\$ 784,5 milhões exportados nos sete primeiros meses de 2003.

Nesse contexto, a bovinocultura de corte merece destaque como foco de emprego de biotecnologias que aumentem a produtividade do setor. O melhoramento genético e o aumento da eficiência reprodutiva das matrizes de corte são fundamentais para o alcance de metas anuais superiores às do ano que se antecedeu. Assim a transferência de embriões (TE), que é o método mais empregado no mundo para a disseminação de material genético feminino de alto valor, acelera o ganho genético (BÓ, 2000) e possibilita a comercialização de material genético entre continentes (THIBIER, 2001).

O último relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (THIBIER, 2003) relata as estatísticas de TE durante o ano de 2002 e atenta ao aumento no número de embriões bovinos produzidos por múltipla ovulação e transferência de embriões inovulados e comunicados (538.312), 20 % maior do que o registrado no ano anterior (2001). Destaque para o aumento no número de embriões bovinos produzidos *in vitro* (83.329), particularmente pela participação do Brasil e da República Popular da China. Esse aumento do número de embriões transferidos no mundo deveu-se, principalmente, ao aumento no número de países que reportaram ou aumentaram a abrangência dos relatos da atividade, como nos casos da China, Índia, Colômbia, Croácia, Moldávia, Namíbia, Sudão, Zâmbia, Zimbábue e Austrália. Em outros países houve um aumento real na atividade, particularmente no caso do Brasil. Em contrapartida, observou-se uma redução da atividade na Europa e nos Estados Unidos.

O número de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transferidos (83.329) também apresentou um aumento significativo, sendo mais do que o dobro das transferências comunicadas no ano anterior, e representando 15,5% das realizadas no mundo. Novamente, o Brasil aparece em posição de destaque, contribuindo com quase 50% do total. Estes números confirmam a expansão observada no mercado nacional de produção *in vitro* de embriões, particularmente alavancado pelo mercado de corte e, em especial, pelos altos valores alcançados por matrizes de raças zebuínas.

Dentre os inúmeros fatores determinantes para o sucesso de programas de TE as receptoras merecem grande destaque por serem fator determinante no sucesso desta biotecnologia (HASLER, 2001; SPELL et al., 2001). O alto custo de manutenção de fêmeas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* não gestantes como

receptoras de embrião aliado a baixas taxas de aproveitamento<sup>1</sup> (BÓ et al., 2002) eleva o custo de aplicação desta biotecnologia. O aumento da eficiência reprodutiva destes animais é de grande importância para a maior viabilidade econômica de programas de TE bovinos. Dessa forma, tratamentos hormonais que visem aumentar a taxa de aproveitamento e a de concepção<sup>2</sup> dessas receptoras serão de grande valia para a rentabilidade da técnica e da propriedade rural.

---

<sup>1</sup> Taxa de aproveitamento = [(número de receptoras aptas à TE) / (número de receptoras tratadas)] \* 100

<sup>2</sup> Taxa de concepção = [(número de receptoras gestantes) / (número de receptoras inovuladas)] \* 100

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CICLO ESTRAL

O ciclo estral em bovinos apresenta duração média de 17 a 25 dias (SIROIS; FORTUNE, 1988) e é regido por interações e antagonismos endocrinológicos de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, gônadas e útero (MACMILLAN; BURKE, 1996). Esse período pode ser dividido em duas fases distintas: a folicular ou estrogênica, que se estende do pro-estro ao estro culminando na ovulação, e a luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro terminando na luteólise (MACMILLAN; BURKE, 1996).

Quanto ao desenvolvimento dos folículos nesses estágios, a fase folicular consiste no período após a luteólise em que ocorre o crescimento folicular sob baixas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e alta pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH), culminando na ovulação. Na fase luteínica ocorre o crescimento folicular sob maiores concentrações de P4 secretada pelo corpo lúteo (CL), ocorrendo crescimento e atresia dos folículos devido à diminuição da pulsatilidade e ausência do pico de LH.

A ultra-sonografia possibilitou a confirmação da existência de ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral e em outras fases da vida reprodutiva da fêmea bovina (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; KNOPF et al., 1989; PIERSON; GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Uma onda apresenta duração de 7 a 10 dias,,

sendo descritas 2 a 3 ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989). Em Bó, Baruselli e Martinez (2003) comparou-se a dinâmica folicular durante o ciclo estral entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, verificando-se a presença de até 4 ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral de animais *Bos indicus* (4/25), enquanto não foi constatado esse número de ondas em *Bos taurus* (0/17). Esse relato também foi descrito anteriormente por Rhodes, De'ath e Entwistle (1995) e por Zeitoun, Rodriguez e Randel (1996).

Townson et al. (2002) avaliaram a fertilidade de vacas Holandesas, submetidas à inseminação artificial (IA), que apresentaram 2 ou 3 ondas de crescimento folicular. Os animais que apresentavam 3 ondas durante o ciclo obtiveram maior taxa de concepção que os com 2 ondas (81,2 vs. 62,5%,  $P < 0,05$ ). Esses achados também foram verificados em vacas de corte (AHMAD et al., 1997), apesar de não ter sido verificada diferença estatística.

Esses dados sugerem que as fêmeas com 3 ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral apresentam maior fertilidade que as de 2 ondas. Essa diferença pode ser explicada pelo menor tempo de crescimento do folículo ovulatório em animais de 3 ondas, melhorando a qualidade do oócito (TOWNSON et al., 2002).

Ainda quanto às diferenças encontradas entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, verificou-se que os diâmetros do folículo dominante e do CL em *Bos indicus* são menores que em *Bos taurus* (FIGUEIREDO et al., 1997). No que diz respeito à população folicular demonstrou-se que os ovários de novilhas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos  $< 5$  mm no início da onda de crescimento folicular que novilhas *Bos taurus* (BURATINI JR. et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; SEGERSON et al., 1984).

Algumas diferenças endocrinológicas também têm sido relatadas. O gado Zebu apresenta menor capacidade de secreção de LH (D'OCCHIO; NEISH; BROADHURST, 1990; RANDEL, 1976) e reduzidos níveis circulantes de estradiol (E2) e P4 (RANDEL, 1984; SEGERSON et al., 1984) em relação às raças européias.

Cada onda de crescimento folicular é dividida em 4 fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002; GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989). A emergência de uma onda é caracterizada por um repentino crescimento de mais de 20 pequenos folículos, detectados por ultra-sonografia, com diâmetro de 2 a 4 mm (CARVALHO et al., 2004; GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989), sendo estimulada pela secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise (ADAMS et al., 1992).

O número de ondas foliculares em um animal corresponde exatamente com o número de descargas de FSH (ADAMS et al., 1992). Após o pico de FSH e o declínio dos níveis circulantes desse hormônio, por retroalimentação negativa dos produtos intra-foliculares da nova onda ocorre atresia dos folículos subordinados recrutados no início da nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1997).

A taxa de crescimento folicular é semelhante para todos os folículos até o momento da seleção (GINTHER, 2000). No entanto, na seleção um folículo passa a apresentar maior taxa de crescimento que os outros (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002; GINTHER, 2000; MAPLETOFT; BÓ; ADAMS, 2000), caracterizando o desvio ou a divergência folicular. Nesse momento o folículo dominante apresenta diâmetro em torno de 8,5 mm em animais *Bos taurus* (GINTHER et al., 1999; KULICK et al., 1999) e de 6,0 mm em *Bos indicus* (SARTORELLI et al., 2003).

A partir do desvio fica estabelecida a dominância folicular, na qual o folículo dominante permanece crescendo continuamente enquanto os folículos subordinados



diminuem sua taxa de crescimento e entram em atresia (GINTHER et al., 2001). O folículo dominante é caracterizado pelo seu crescimento constante e pela crescente capacidade de produzir E2, por menores concentrações de proteínas ligantes aos receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) 2, 4, 5 e folistatina, e pelo aumento nas concentrações intrafoliculares de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) do tipo I (GINTHER et al., 2001; MIHM; AUSTIN, 2002). Contrariamente, os folículos destinados à subordinação têm reduzida capacidade de produzir E2, elevadas concentrações de IGFBP 1 e 3 (MIHM et al., 2002) e bloqueio do crescimento.

Durante a dominância ocorre a queda das concentrações de FSH e aumento da secreção de LH, quando a partir deste momento, o folículo selecionado passa a ser LH dependente (GINTHER et al., 1996). Caso ocorra a luteólise, a P4 plasmática entrará em declínio e proporcionará condições favoráveis para que as células da teca e da granulosa do folículo dominante secretem E2 (NISWENDER et al., 2000) e por um sistema de retroalimentação positiva estimule a secreção de LH, levando à ovulação (BINELLI et al., 2001).

Após o processo ovulatório ocorre a formação do CL no local em que estava presente o folículo ovulatório. Predominantemente, as células foliculares da granulosa dão origem às células grandes do CL, e as da teca dão origem às pequenas (NISWENDER et al., 2000). Gradualmente ocorre o aumento do tamanho do CL e da sua capacidade de secretar P4 (NISWENDER et al., 2000). Depois de atingida a capacidade máxima, a produção de P4 se estagna até em torno do dia 16-17 do ciclo estral (RATHBONE et al., 2001) quando ocorrerá a luteólise. A P4 age sobre o eixo hipotálamo-hipofisário e no trato reprodutivo para preparar este tecido para receber e manter a gestação (GEISERT et al., 1992; RATHBONE et al., 2001).

A P4 interfere diretamente na dinâmica folicular do ciclo estral, no reconhecimento materno da gestação e no seu estabelecimento (BINELLI et al., 2001). Existem relatos de interferência das altas concentrações plasmáticas da P4 durante o diestro sobre o crescimento folicular neste período (BERGFELT; KASTELIC; GINTHER, 1991; LUCY et al., 1992). Adams, Matteri e Ginther (1992) relataram que fêmeas de 3 ondas de crescimento folicular apresentaram menor diâmetro máximo do folículo dominante da segunda onda, quando comparado ao da primeira. Os autores creditam este efeito à fase do ciclo estral que ocorre o crescimento folicular (o folículo da primeira onda cresce durante o metaestro sob menores concentrações plasmáticas de P4, e o da segunda cresce durante o diestro sob maiores concentrações plasmáticas de P4). As concentrações de FSH não foram afetadas pelas concentrações circulantes de P4. Desta forma, este efeito pode ter ocorrido pela inibição exercida sob a secreção de LH (FIKE et al., 2004; NETT et al., 2002; SANCHEZ et al., 1995), que reduziu o diâmetro folicular após a seleção do folículo dominante.

Caso o concepto esteja presente no útero entre os dias 14 e 17, e ocorra secreção adequada de interferon- $\tau$  (proteína secretada pelo trofoderma do concepto responsável pelo reconhecimento materno da gestação), não ocorrerá a liberação de protaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e a P4 continuará a ser secretada para a manutenção da prenhez (NORTHEY; FRENCH, 1980; RATHBONE et al., 2001). Caso exista comprometimento na produção de interferon- $\tau$  ou ausência do feto nesse período ocorrerá a liberação de  $PGF_{2\alpha}$  e a queda dos níveis plasmáticos de P4, proporcionando condições favoráveis para o crescimento folicular e ovulação (BINELLI et al., 2001; RATHBONE et al., 2001). A  $PGF_{2\alpha}$  é responsável pelo

fenômeno da luteólise e é secretada em pulsos pelo endométrio uterino (OKUDA; MIYAMOTO; SKARZYNSKI, 2002).

Em ovelhas tem sido proposto que o início da luteólise depende da ativação de receptores de ocitocina no endométrio uterino, estimulada pela exposição do útero a adequadas concentrações de esteróides ovarianos – P4 e E2 (SILVIA, 1999; SPENCER et al., 2004). Assim, um pulso de ocitocina desencadeado pela hipófise liga-se aos receptores de ocitocina no útero, desencadeando a produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (MCCRACKEN et al., 1995), que por um mecanismo de retroalimentação positiva com o CL, culmina na luteólise. Em vacas também foi proposto essa teoria, no entanto o bloqueio dos receptores de ocitocina por um antagonista específico (CAP-527) não impediu a secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , nem a luteólise. Os animais tratados com CAP-527 tiveram a duração do ciclo estral semelhante à do grupo controle (KOTWICA et al., 1997). Em bovinos existem indícios de o mecanismo da luteólise não ser dependente apenas dos receptores de ocitocina.

Diversos autores mostraram o envolvimento do E2 na luteólise e na secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . A irradiação dos folículos ovarianos, eliminando a produção folicular de E2 (HUGHES et al., 1987), assim como a cauterização dos folículos (VILLA-GODOY et al., 1985) retardaram a luteólise e aumentaram a duração do ciclo estral em bovinos e ovinos.

## 2.2 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

### 2.2.1 Tratamento com Prostaglandina $F_{2\alpha}$ para Sincronização do Estro

A  $PGF_{2\alpha}$  foi descoberta no início da década de 70 como um potente agente luteolítico (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 (LARSON; BALL, 1992; ODDE, 1990). O sucesso da sincronização do estro com  $PGF_{2\alpha}$  depende da presença de um CL, já que a ação da luteolisina é provocar a regressão morfológica e funcional dessa estrutura (RATHBONE et al., 2001), o que leva à queda dos níveis endógenos de  $P4$ . A resposta ao tratamento com  $PGF_{2\alpha}$  é influenciada pela maturidade do CL. Tratamentos realizados até o dia 5 do ciclo estral não induzem efetivamente a luteólise (PARFET et al., 1989; REFSAL; SEGUIN, 1980).

O CL maduro possui um sistema de retroalimentação positiva que resulta na produção intraluteínica de  $PGF_{2\alpha}$ , possibilitando a continuidade do processo luteolítico iniciado por uma única aplicação exógena de dessa luteolisina (OKUDA; MIYAMOTO; SKARZYNSKI, 2002; WILTBANK, 1997). Após a luteólise, o estro e a ovulação são distribuídos ao longo de 6 dias e são influenciados pelo estágio de desenvolvimento do folículo dominante (KASTELIC; GINTHER, 1991).

Kastelic, Knopf e Ginther (1990) constataram que quando o tratamento com  $PGF_{2\alpha}$  é realizado no dia 5 do ciclo estral (momento em que o folículo dominante da

primeira onda ainda está em fase de crescimento) o intervalo entre a aplicação e a ovulação é de 3 dias. Se o tratamento é realizado no dia 12 do ciclo estral (quando o folículo dominante da segunda onda encontra-se no início da fase de crescimento) a ovulação ocorre 4,5 dias após a aplicação. Bovinos tratados no dia 8 do ciclo estral freqüentemente apresentam ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular 2 dias após a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . No entanto, ocasionalmente pode ocorrer a ovulação do segundo folículo dominante 6 dias após o tratamento. Baruselli et al. (2000a) trataram receptoras de embrião cíclicas com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e detectaram por ultrasonografia as ovulações nesses animais. O estro e a ovulação foram distribuídos uniformemente de 42 a 102 h após o tratamento.

Em bovinos de raças européias, a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tem induzido elevadas porcentagens (70 a 100 %) de manifestação de estro (LAVERDIERE et al., 1995; TANABE; HANN, 1984), no entanto em *Bos indicus* geralmente não são observadas essas taxas. Moreno et al. (1986) avaliaram previamente os ovários de vacas *Bos indicus* para detectar a presença de CL e as trataram com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Observaram 80 a 100% de luteólise, no entanto apenas 47 a 60% das vacas foram detectadas em estro após o tratamento.

Em função dos fatores relatados, faz-se necessária a detecção do cio das receptoras após a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para a realização da TE, impossibilitando programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

A alta variabilidade das respostas ao tratamento com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e o fato de animais criados a pasto em condições tropicais apresentarem alta incidência de anestro (ausência de CL) têm comprometido a eficiência do tratamento. Assim, torna-se necessário o emprego de métodos que controlem o desenvolvimento luteínico e folicular para sincronizar o crescimento dos folículos e a ovulação,

permitindo o emprego da TETF sem a detecção de cio (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003).

### 2.2.2 Controle da Dinâmica Folicular para Realização da Transferência de Embriões em Tempo Fixo

A sincronização da ovulação para TETF procura induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular sincronizada, controlar a duração do crescimento folicular e da fase luteínica sincronizando a retirada da P4 exógena (dispositivo) e endógena (PGF<sub>2α</sub>), e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais tratados.

#### 2.2.2.1 Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Mecânicos

A cauterização do folículo dominante (KO et al., 1991) ou a sua ablação guiada por ultra-sonografia (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS, 1994; BÓ et al., 1995a) anula os efeitos de dominância levando a uma descarga de FSH, que induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 2 dias (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS, 1994). Martinez et al. (2000) encontraram a emergência de nova onda de crescimento folicular  $1,0 \pm 0,1$  dias após a ablação

dos folículos maiores que 5 mm. No entanto, estes métodos apresentam alto grau de dificuldade de aplicação no campo, apesar da sua eficiência.

### **2.2.2.2 Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Farmacológicos - Estrógenos Associados a Progesterona**

Os E2, quando administrados na presença de P4 endógena ou exógena, causam a diminuição dos níveis circulantes de FSH e LH provocando a regressão dos folículos gonadotróficos dependentes. Após a metabolização e a diminuição das concentrações plasmáticas de E2 verifica-se o surgimento de um pico de FSH e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Esses efeitos foram demonstrados em uma série de estudos na década de 90 (BÓ et al. 1993; BÓ et al., 1994, BÓ et al., 1995ab; BÓ; PIERSON; MAPLETOFT, 1991; MARTINEZ et al., 2000).

O estradiol 17- $\beta$  produzido pelo folículo na ausência de P4 leva à liberação de GnRH pelo hipotálamo, que estimula a produção de LH pela hipófise culminando na ovulação (RATHBONE et al., 2001). Assim, a administração de E2 durante a fase folicular do ciclo estral associado ao E2 endógeno leva a um efeito ovulatório, contrariando os efeitos descritos até o momento. Por isso é importante que elevados níveis de P4 estejam presentes no momento do tratamento com E2 para evitar um pico pré-ovulatório de LH (BÓ et al., 1994). Para isso, o tratamento com P4 exógena bloqueia o pico de LH (BERGFELD et al., 1995; KOJIMA et al., 1992; ROBERSON

et al., 1989), evitando a ovulação do folículo dominante em animais tratados com E2 que estejam na fase estrogênica do ciclo estral.

Existem diferentes ésteres de E2 [Estradiol 17 $\beta$ , Benzoato de estradiol (BE), Valerato de estradiol (VE) e Cipionato de Estradiol (CE)]. O VE (BÓ et al., 1995b) e o CE (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003), na presença de P4, causam a regressão dos folículos antrais presentes no ovário. No entanto, a meia vida longa desses ésteres, pela baixa solubilidade em água, leva a um atraso e a uma alta dispersão do dia da emergência da onda de crescimento folicular. O BE (SÁ FILHO et al., 2004) e o estradiol 17 $\beta$  (BÓ et al., 1995b) apresentam meia vida mais curta que os anteriores, induzindo a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular em um grupo de animais tratados.

Bó et al. (1995b) testaram a hipótese que a administração intra muscular (IM) de estradiol-17 $\beta$  associado a um implante Syncro-Mate-B em qualquer fase do ciclo estral levaria a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular em um grupo de animais. Para os dias 3, 6 e 9 do ciclo estral, encontraram a emergência da onda 4,3  $\pm$  0,3; 4,7  $\pm$  0,2 e 4,1  $\pm$  0,3 dias após o tratamento, respectivamente, obtendo uma média de 4,3  $\pm$  0,2 dias para todos os animais, confirmando a hipótese testada.

Martinez et al. (2000) realizaram um experimento testando diversas estratégias de indução de nova onda de crescimento folicular. Para os animais tratados com dispositivo intravaginal contendo P4 e 5 mg de estradiol 17- $\beta$  encontraram um valor de 3,4  $\pm$  0,1 dias de intervalo entre o tratamento e a emergência. Esses valores discrepantes entre o trabalho de Bó et al. (1995b) e Martinez et al. (2000) são creditados à qualidade das imagens ultra-sonográficas, pois uma diferença de 5 anos esta presente entre as duas publicações.



Sá Filho et al. (2004) detectaram uma nova onda de crescimento folicular em  $3,6 \pm 0,7$  dias após o tratamento com 2 mg de BE, 50 mg de P4 injetável e dispositivo intravaginal contendo P4 em novilhas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus*. Os autores não observaram diferença entre animais que se encontravam no diestro e animais que se encontravam na fase folicular do ciclo estral.

A administração de P4 injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal e E2 levou a um maior sincronismo da emergência de nova onda de crescimento folicular quando comparada ao tratamento apenas com o dispositivo e E2 (MORENO et al., 2001). Para verificar esse efeito Nasser et al. (2004) testaram a exclusão da P4 injetável no início do tratamento de receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* com BE e dispositivo intravaginal contendo P4. Independentemente dos tratamentos a partir desse momento, os efeitos principais não mostraram benefício da P4 injetável sobre a taxa de aproveitamento das receptoras (sem: 86,7 vs. com: 87,4%), taxa de concepção (sem: 52,3 vs. com: 48,5%) e de prenhez<sup>1</sup> (sem: 45,3 vs. com: 42,4). Conclusões semelhantes foram relatadas para a inseminação artificial em tempo fixo (COLAZO et al., 2004; CUTAIA et al., 2001) em bovinos de corte.

---

<sup>1</sup> Taxa de prenhez = [(número de receptoras gestantes) / (número de receptoras tratadas)] \* 100

### **2.2.2.3 Sincronização da Emergência de Nova Onda de Crescimento Folicular por Métodos Farmacológicos - Ovulação do Folículo Dominante**

A ovulação do folículo dominante e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular estão estreitamente relacionadas. O processo ovulatório pode ser induzido diretamente, administrando fármacos (LH e hCG) que se ligam aos receptores de LH do folículo ou pela indução da secreção pulsátil do LH endógeno com a administração de GnRH ou E2 (o E2 age como indutor da ovulação somente sob baixas concentrações de P4). Durante o processo de ovulação verifica-se uma queda da secreção de E2 e de fatores responsáveis pelo bloqueio da secreção de FSH na hipófise (ADAMS et al., 1992). Como consequência, ocorrerá uma descarga de FSH, responsável pela emergência e pelo desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1996). Após a ovulação verifica-se a emergência de uma nova onda entre 1 e 2 dias.

O trabalho de pesquisa que deu origem ao protocolo "Ovsynch" (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995) relata que a emergência da onda de crescimento folicular após a ovulação do folículo dominante foi de  $2,10 \pm 0,31$  dias para vacas e de  $1,50 \pm 0,47$  dias para novilhas.

Para a indução da ovulação, a fase em que se encontra o folículo é fator determinante. Martinez et al. (1999) avaliaram a eficiência da administração de GnRH e LH em cada fase da onda de crescimento folicular em novilhas. Os tratamentos foram realizados no dia 3 (crescimento), 6 (estática inicial) e 9 (estática final) do ciclo estral. Os autores verificaram que animais que apresentavam folículos grandes (fase de crescimento ou platô inicial) tiveram as melhores respostas ao

tratamento para se induzir a ovulação. Foram encontradas as seguintes taxas de ovulação para os dias 3, 6 e 9, respectivamente: LH (67, 100 e 67%) e GnRH (89, 56 e 22%) com uma taxa média de 78 e 56% para o LH e o GnRH, respectivamente. Os animais que não ovularam não tiveram seu desenvolvimento folicular alterado. Neste experimento, o tratamento (GnRH ou LH) não foi associado ao um consistente intervalo para a emergência de uma nova onda ( $3,1 \pm 0,7$  dias após o tratamento no dia 3 vs.  $0,4 \pm 0,4$  dias após o tratamento no dia 9).

#### **2.2.2.4 Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Prostaglandina $F_{2\alpha}$**

É preconizada a aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  no momento da retirada da fonte de P4/progestágenos para indução da luteólise e queda dos níveis endógenos de P4, propiciando condições favoráveis à ovulação. O mecanismo de ação da  $PGF_{2\alpha}$  foi descrito anteriormente nessa dissertação.

#### **2.2.2.5 Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Progesterona / Progestágenos**

A P4 e os progestágenos são substâncias que podem ser administradas por via oral, por implantes subcutâneos ou por dispositivos intravaginais. Esses compostos têm sido utilizados por períodos prolongados desde a década de 60 com

o intuito de permitir a regressão espontânea do CL, o que leva à sincronização do estro entre 2 e 4 dias após a remoção da fonte de P4/progestágeno (RATHBONE et al., 2001). Esses tratamentos longos (14 a 21 dias) são efetivos para sincronizar o estro, no entanto a fertilidade dessa ovulação é reduzida (HANSEL; MALVEN; BLACK, 1961; WILTBANK et al., 1965) por induzir a ovulação de folículos persistentes (ODDE, 1990), com conseqüente envelhecimento do oócito que provoca baixa fertilidade (REVAH; BUTLER, 1996).

Revah e Butler (1996) descreveram a maturação espontânea do oócito (quebra da vesícula germinativa e expansão do *cúmulus*) em 23/23 folículos dominantes persistentes comparados aos 5/29 dos folículos dominantes em crescimento. No entanto, para receptoras de embrião que o interesse é pelo CL formado, o folículo persistente resulta em um CL de maior diâmetro e com maior capacidade de secretar P4 (MANTOVANI et al., 2004a).

O tratamento com P4/progestágenos associado ao E2 para sincronização da nova onda de crescimento folicular e à PGF<sub>2α</sub> como agente luteolítico proporciona adequadas taxas de sincronização do cio e da ovulação possibilitando a TETF (BÓ et al., 2002).

#### **2.2.2.6 Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral - Efeito Luteolítico do Tratamento com Estradiol**

Wiltbank, Ingalls e Rowden (1961) observaram que os estrógenos eram capazes de induzir a regressão luteal. Pensando nesse efeito, o primeiro

experimento que empregou dispositivo intravaginal contendo P4 para IATF (ROCHE, 1976) com sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular utilizou 5 mg de BE no início do protocolo para regressão do CL.

Martínez, Kastelic e Mapletoft (2004) trataram novilhas de corte durante o diestro com 2 mg de BE com intuito de sincronizar a emergência folicular utilizando a P4 endógena (CL) para realização da IATF e obtiveram 27,6% de luteólise (manifestação de cio e ovulação antes da segunda aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ). Os E2 de meia vida longa são incorporados em alguns protocolos de sincronização da ovulação para TETF com o objetivo de provocar luteólise e eliminar a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

#### **2.2.2.7 Indução Sincronizada da Ovulação**

Os fármacos utilizados para a indução da ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (E2 e GnRH) ou agem diretamente nos receptores de LH das células da granulosa dos folículos (hCG e LH). Os indutores de ovulação quando administrados isoladamente não são capazes de sincronizar adequadamente a ovulação para a TETF. No entanto, quando associados a P4/progestágenos, E2 e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induzem ovulação sincronizada do folículo dominante presente no final do tratamento, possibilitando o emprego da TETF.

## 2.3 PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA TETF

### 2.3.1 GnRH/PGF<sub>2α</sub>/GnRH – “Ovsynch”

Para viabilizar a TETF em bovinos é necessário diminuir a variação do tempo de ovulação após o tratamento com PGF<sub>2α</sub>. Assim, alguns pesquisadores investigaram o emprego de análogos do GnRH (com a finalidade de induzir a ovulação e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular), seguido da aplicação de PGF<sub>2α</sub> depois de 6 (TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995) ou 7 dias (THATCHER et al., 1993).

O tratamento com GnRH em dias desconhecidos do ciclo estral promove a ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento (WILTBANK, 1997) e uma nova onda de crescimento folicular emerge após 1 a 2 dias (BODENSTEINER et al., 1996; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995). Twagiramungu, Guilbault e Dufour (1995) propuseram o uso de um segundo tratamento com GnRH após a PGF<sub>2α</sub> para assegurar a ovulação do novo folículo dominante, melhorando a precisão do estro e da ovulação.

Uma modificação do esquema de duas doses de GnRH foi proposto por Pursley, Mee e Wiltbank (1995) e foi denominado de protocolo “Ovsynch” para IATF sem detecção do estro em vacas de leite. Esse método consiste em uma injeção de GnRH seguida por PGF<sub>2α</sub> 7 dias mais tarde e uma segunda injeção de GnRH 48 h depois do tratamento com PGF<sub>2α</sub>, seguida da IATF 18 a 24 horas mais tarde.

Vasconcelos et al. (1999) obtiveram 64% de taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH em 156 vacas Holandesas tratadas em diferentes períodos do ciclo estral. Os autores observaram variação das taxas de ovulação conforme a fase do ciclo estral em que as fêmeas foram tratadas, com menores índices nos animais que se encontravam entre os dias 1 e 4 (23%), e maiores naqueles que estavam entre os dias 5 e 9 (96%). As taxas de ovulação após a segunda dose de GnRH (87%) não foram influenciadas pela fase do ciclo estral, mas variaram de acordo com a resposta à primeira aplicação do hormônio (92% quando houve ovulação e 79% quando não houve ovulação).

Transpondo o raciocínio da uma ovulação sincronizada permitindo a IATF para a TETF, diversos estudos foram realizados com o intuito de eliminar a detecção de cio em programas de TE. Baruselli et al. (2000a) verificaram que novilhas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* tratadas com o protocolo “Ovsynch” apresentam maior taxa de ovulação (74,3%; 26/35) que aquelas tratadas com dose única de PGF<sub>2α</sub> (58,8%; 20/34). Verificaram ainda que os animais sincronizados somente com PGF<sub>2α</sub> apresentaram maior dispersão das ovulações, confirmando que somente a aplicação de PGF<sub>2α</sub> não sincroniza eficientemente a ovulação.

Em um programa comercial de transferência de embriões, os mesmos tratamentos descritos anteriormente foram testados a campo (BARUSELLI et al., 2000b). Novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* (n=345) foram submetidas ao tratamento com PGF<sub>2α</sub> (n=177) e observação de cio por 5 dias com posterior ultra-sonografia e TE 7 dias após a detecção do estro, ou tratadas com protocolo “Ovsynch” (n=168) e submetidas a ultra-sonografia 7 dias depois do último GnRH para detectar a ovulação. As novilhas do grupo “Ovsynch” apresentaram maior taxa de aproveitamento que as do grupo PGF<sub>2α</sub> (72,6 vs. 45,2%, P<0,05). As taxas de

concepção dos grupos “Ovsynch” e PGF<sub>2α</sub> foram estatisticamente semelhantes (49,2 vs. 56,3%, respectivamente). A taxa de prenhez do grupo “Ovsynch” foi superior (35,7 vs. 25,4 %, P<0,05). Os resultados demonstraram um maior número de receptoras aptas a serem inovuladas, e conseqüentemente, uma maior taxa de prenhez, sem a necessidade da detecção do cio.

No entanto em outro trabalho (ZANENGA et al., 2000) não se verificou esses efeitos descritos anteriormente. Os autores encontraram taxa semelhantes entre os mesmos grupos experimentais, no entanto enfatizam a vantagem de se eliminar a detecção do cio. Para novilhas, encontrou-se taxas de aproveitamento de 66,6 % (PGF<sub>2α</sub>) e 74,4 % (“Ovsynch”); de concepção de 68,0 % (PGF<sub>2α</sub>) e 75,0 % (“Ovsynch”); e de prenhez de 45,3 % (PGF<sub>2α</sub>) e 55,8 % (“Ovsynch”). Para vacas, encontrou-se taxas de aproveitamento de 51,7 % (PGF<sub>2α</sub>) e 63,6 % (“Ovsynch”); de concepção de 60,0 % (PGF<sub>2α</sub>) e 57,1 % (“Ovsynch”); e de prenhez de 31,0 % (PGF<sub>2α</sub>) e 36,4 % (“Ovsynch”).

Ambrose et al. (1999) hipotizaram que vacas de leite de alta produção (n=404) sob stress térmico apresentariam maior taxa de prenhez se recebessem um embrião ao invés de serem inseminadas artificialmente. Os autores testaram também as taxas de concepção de embriões frescos e congelados produzidos *in vitro*. Empregou-se o protocolo “Ovsynch” para todos os animais e os grupos foram divididos quanto ao procedimento empregado (IA vs. TE) e quanto ao embrião (fresco vs. congelado). Pela concentração plasmática de P4 ( $\leq 1,5$  ng/ml no dia 0 e  $\geq 2,0$  ng/ml) após a ovulação determinou-se a taxa de aproveitamento, encontrando-se um total geral de 76,2 %.



Com o uso do protocolo “Ovsynch” aumentou-se a taxa de aproveitamento e a taxa de prenhez final. Ainda, eliminou-se a necessidade de detecção de estro de receptoras em programas de TE.

### **2.3.2 Progesterona, Benzoato de Estradiol e PGF<sub>2α</sub>**

Atualmente existem no mercado diversos dispositivos liberadores de P4/progestágeno com a finalidade de sincronizar a ovulação para a IATF e TETF (DIB<sup>®</sup>, CIDR<sup>®</sup>, Cronipress<sup>®</sup>, PRID<sup>®</sup>, Crestar<sup>®</sup>). Estes produtos são inseridos na vagina ou sob a cartilagem auricular por um determinado período e sua finalidade é manter concentrações subluteais de P4, evitando a ovulação nesse período e permitindo o crescimento folicular. O trabalho que descreve o desenvolvimento de um dos dispositivos intravaginais contendo P4 encontrados no mercado (MACMILLAN et al., 1991) relata que novilhas ovariectomizadas tratadas com o dispositivo por 12 dias apresentaram uma concentração plasmática de P4 média de  $5,6 \pm 0,1$  ng/ml. Os valores médios diários variaram de  $8,7 \pm 0,3$  ng/ml (6 horas após a inserção) a  $2,5 \pm 0,2$  ng/ml (retirada do dispositivo).

Para evitar a formação de um folículo persistente preconiza-se sincronizar a onda de crescimento folicular, para que todos os animais tenham um novo folículo em crescimento com capacidade ovulatória após a remoção da fonte de P4, e desse modo formar um CL saudável para a realização da TETF 7 dias depois. Assim, verificou-se que a associação de P4 e estrógenos no início do tratamento suprime o crescimento dos folículos e sincroniza a emergência de nova onda de crescimento

folicular como descrito anteriormente nessa dissertação. A regressão luteínica em animais cíclicos é alcançada pela aplicação de E2 no início do tratamento ou pela administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento da remoção da fonte de P4.

Com a finalidade de aumentar a taxa de ovulação, pesquisadores estudaram o efeito da administração de E2 24 horas após a retirada dos dispositivos de P4, visando induzir um pico de LH sincronizado (HANLON et al., 1996; MACMILLAN; BURKE, 1996; MARTÍNEZ et al., 1998). Verificaram que a aplicação de BE aumenta e sincroniza a ovulação no grupo de animais tratados. Os efeitos dessa administração de BE foram descritos por Marques et al. (2003), que mostraram que a administração de BE 24 horas após a retirada do CIDR<sup>®</sup> em primíparas *Bos indius* x *Bos taurus* aumenta a taxa de ovulação (80,8 vs. 54,2 %,  $P < 0,05$ ), antecipa e sincroniza eficientemente a ovulação ( $69,4 \pm 2,0$  vs.  $86,3 \pm 4,8$ ; Teste de Bartlett:  $P < 0,05$ ).

Os tratamentos com E2/P4/ $\text{PGF}_{2\alpha}$  foram utilizados em receptoras de embrião para eliminar a necessidade de detecção do estro (TRÍBULO et al., 2000). Vacas do grupo E2/P4 receberam um dispositivo intravaginal contendo P4 (CIDR-B) associado a 2 mg de BE e 50 mg de P4 IM no dia 0,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no momento da remoção do CIDR-B (dia 7) e 1 mg de BE no dia 8. Não observou-se o estro (considerado o dia 9). As vacas do grupo controle foram tratadas com 2 doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com 14 dias de intervalo e submetidas a observação de estro por 5 dias. Sete dias após o estro (grupo controle) ou após o dia esperado do estro (grupo E2/P4), todos os animais que apresentavam um CL ( $> 15$  mm estimado por palpação retal) receberam por transferência direta um embrião descongelado. As taxas de aproveitamento (controle: 60,0% vs estrógeno/progesterona: 59,0%;  $P > 0,05$ ) e de prenhez não

diferiram entre os tratamentos (controle: 32,0% vs estrógeno/progesterona: 37%;  $P > 0,6$ ).

Em um seguinte experimento o mesmo grupo de pesquisa comparou as taxas de prenhez em receptoras tratadas com CIDR por 7 ou 8 dias (BÓ et al., 2001). Não observou-se diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os grupos sobre a taxa de aproveitamento das receptoras [7 dias: 46,2 % (30/65) vs. 8 dias: 56,3 % (36/64)], taxa de concepção [7 dias: 43,3 % (13/30) vs. 8 dias: 41,7 % (15/36)] e de prenhez [7 dias: 20,0 % (13/65) vs. 8 dias: 23,4 % (15/64)].

Baruselli et al. (2001) trataram novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* receptoras de embrião com CIDR por 7 dias, 2 mg de BE no dia 0,  $PGF_{2\alpha}$  no momento da retirada do CIDR (dia 7) e 0,5 mg de BE no dia 8. O dia do estro foi considerado o dia 9 e no 16 todos os animais foram examinados por ultra-sonografia para avaliação ovariana. Animais que apresentaram CL > 12 mm de diâmetro receberam um embrião descongelado produzido por MOET. Os autores verificaram uma taxa de aproveitamento para TETF de 34,0 % (17/50), de concepção de 29,4 % (5/17) e de prenhez de 10,0 % (5/50).

Por esses trabalhos concluí-se que esse tratamento eliminou a necessidade de detecção de cio, sem comprometimento das taxas de prenhez, comparado aos tratamentos com  $PGF_{2\alpha}$  e subsequente observação de estro. Apesar do uso de E2 e P4 ter eliminado a detecção do cio, as taxas de prenhez mantiveram-se em torno de 20 a 35%, necessitando serem aumentadas (BÓ et al., 2002). Esse fato deve-se às baixas taxas de ovulação encontradas em novilhas tratadas com E2 e dispositivos intravaginais contendo P4.

As baixas taxas de ovulação foram confirmadas em duas dinâmicas foliculares realizadas no Brasil pelo nosso grupo de pesquisa. Marques et al. (2003)

trataram primíparas *Bos indicus* x *Bos taurus* com esse protocolo a base de E2 e P4 (CIDR por 8 dias). Os animais foram examinados por ultra-sonografia a partir do momento da retirada do CIDR, por 5 dias a cada 12 horas, para caracterização da dinâmica folicular do tratamento. Os autores verificaram uma taxa de ovulação de 60,0 % (15/25) nesses animais.

Na segunda dinâmica, Baruselli et al. (2004) trataram novilhas Nelore (*Bos indicus*) com CIDR por 8 dias, 2 mg de BE no dia 0, PGF<sub>2α</sub> no momento da retirada do CIDR e 1 mg de BE para indução da ovulação no dia 9. Os exames ultra-sonográficos foram realizados nos mesmos moldes que Marques et al. (2003). Encontrou-se taxa de ovulação de 50% (10/20).

Carvalho et al. (2004), em um grande experimento, compararam a dinâmica folicular de animais *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* de aptidão para corte (Nelore, Nelore x Angus e Angus) e para leite (Gir, Girolando e Holandês) durante o tratamento com 2 mg de BE no dia 0, CIDR por 8 dias, PGF<sub>2α</sub> na retirada do dispositivo (dia 8) e 1 mg de BE no dia 9. A ultra-sonografia foi realizada a cada 24 horas do dia 0 ao dia 8, e a cada 12 horas do dia 8 à ovulação. Agrupando-se os animais quanto à genética, encontrou-se taxa de ovulação de 39,1 % para animais *Bos indicus*, 72,7 % para *Bos taurus* e 84,0 % para *Bos indicus* x *Bos taurus*. Os animais *Bos indicus* continuaram com uma baixa taxa de ovulação ao tratamento, no entanto os *Bos indicus* x *Bos taurus* apresentaram taxa de ovulação maiores que as até aqui descritas.

Os trabalhos relataram baixas taxa de ovulação em novilhas *Bos indicus* e suas cruzas e esta peculiaridade da espécie promulgava aos pesquisadores de todo mundo descobrirem estratégias para resolver esse problema.

Uma estratégia pensada e testada por pesquisadores da América do Sul foi a alteração do momento de administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no protocolo a base de P4. Esses pesquisadores justificam que o crescimento do folículo dominante em um ambiente com menores concentrações plasmáticas de P4 levaria o folículo a atingir um maior diâmetro no estágio pré-ovulatório (STOCK; FORTUNE, 1993). Esse fato justifica-se pela inibição exercida pela P4 sobre a pulsatilidade de LH (FIKE et al., 2004; NETT et al., 2002; SANCHEZ et al., 1995). O diâmetro de um folículo saudável em crescimento está diretamente correlacionado com a sua capacidade ovulatória (BURKE et al., 2001; SARTORI et al., 2001).

Um experimento (MORENO et al., 2002) foi elaborado para determinar se com a alteração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do dia 8 para o dia 4, no tratamento com E2 e P4 para sincronização da ovulação, ocorreria um aumento na taxa de aproveitamento, comparada ao tratamento padrão ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  no dia 8). Ainda, foi sugerido que esse folículo atingiria um maior diâmetro pré-ovulatório e formaria um CL de maior tamanho e com maior capacidade de secretar P4. Vacas *Bos indicus* x *Bos taurus* foram tratadas com DIB<sup>®</sup>, 2 mg de BE e 50 mg de P4 IM no dia 0 e foram divididas aleatoriamente para receber  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no dia 4 (esperado dia da emergência da nova onda de crescimento folicular) ou no dia 8 do tratamento (retirada do DIB). No dia 9 todos os animais foram tratados com 1 mg de BE e o dia 10 foi considerado o dia do estro. No dia 16 todas as receptoras foram examinadas por ultra-sonografia e as que apresentavam CL > 10 mm de diâmetro foram selecionadas para TE. O tratamento aumentou ( $P < 0,05$ ) a taxa de aproveitamento [Dia 4: 70,5 % (67/95) vs. Dia 8: 52,7 % (49/93)] e a taxa de prenhez [Dia 4: 41,1 % (39/95) vs. Dia 8: 21,5 % (20/93)], no entanto não aumentou o tamanho do CL.

Em outro experimento (MANTOVANI et al., 2004b), testou-se a mesma hipótese que Moreno et al. (2002), mas com tratamentos diferentes. Quarenta novilhas cíclicas (detecção de CL por palpação retal) foram sincronizadas com duas administrações de PGF<sub>2α</sub> com 12 dias de intervalo. Os animais foram tratados com 2 mg de BE IM e com CIDR<sup>®</sup> no dia 0. O G1 foi tratado com CIDR novo e recebeu PGF<sub>2α</sub> no dia 8, o G2 recebeu o mesmo tratamento do primeiro, no entanto a PGF<sub>2α</sub> foi administrada no dia 5. O G3 e o G4 receberam o mesmo tratamento do segundo, no entanto o CIDR foi previamente utilizado por 8 e 14 dias, respectivamente. No dia 8 retirou-se o CIDR e no dia 9 foi administrado 1 mg de BE em todos os animais. Os exames ultra-sonográficos foram realizados a cada 24 horas do dia 5 ao dia 9 e a cada 12 horas do dia 9 à ovulação. Verificou-se diferença (P<0,05) nas concentrações plasmáticas de P4 médias (G1: 3,3 ± 0,5<sup>a</sup>; G2: 2,0 ± 0,2<sup>b</sup>; G3: 1,9 ± 0,2<sup>b</sup> e G4: 1,5 ± 0,1<sup>b</sup> ng/ml) durante o tratamento. O crescimento folicular foi negativamente correlacionado com a P4 plasmática (r = -0.41, P<0,05). Os autores verificaram um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, conforme era menor a concentração plasmática de P4 (G1: 0,87 ± 0,07<sup>b</sup> vs. G2: 1,00 ± 0,06<sup>a</sup> vs. G3: 1,04 ± 0,07<sup>a</sup> vs. G4: 1,06 ± 0,03<sup>a</sup> mm, P<0,05) e verificaram tendência de aumento da taxa de ovulação pelo tratamento com PGF<sub>2α</sub> no dia 5 (G1: 60,0% (6/10)<sup>c</sup> vs. G2: 80,0% (8/10)<sup>d</sup> vs. G3: 77,8% (7/9)<sup>d</sup> vs. G4: 90,9% (10/11)<sup>d</sup>, P=0,06).

Carvalho et al. (2004) verificaram que novilhas tratadas com 2 mg de BE no dia 0, CIDR por 8 dias, PGF<sub>2α</sub> na retirada do dispositivo (dia 8) e 1 mg de BE no dia 9 que recebiam uma aplicação adicional de PGF<sub>2α</sub> no início do tratamento (dia 0) apresentavam aumento da taxa de ovulação, quando comparados a animais que não receberam PGF<sub>2α</sub> no dia 0 [54,0 (30/37) vs. 78,8 % (26/33), P<0,05].

Com esses tratamentos conseguiu-se aumentar a taxa de ovulação em novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* e conseqüentemente a taxa de aproveitamento de receptoras de embriões bovinos. Outra estratégia foi desenvolvida para aumentar as taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez em receptoras, o uso da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG).

## 2.4 USO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLOS DE TETF

O eCG, previamente chamado de PMSG, é uma gonadotrofina glicoproteica de peso molecular de 70.000 daltons (SCHAMS et al., 1978<sup>2</sup> apud KURAN; HUTCHINSON; BROADBENT, 1996, p. 10) produzida pela placenta de eqüinos durante a gestação (COMBARNOUS, 1992). Entre os dias 25 e 35 da gestação da égua, células do trofoblasto formam um tecido avascularizado chamado de cinta coriônica que circunda o concepto. No dia 35 essas células passam a invadir o endométrio uterino e em 48 horas formam-se estruturas de 0,5 a 1,0 cm chamadas de cálices endometriais (LUNN; VAGNANI; GINTHER, 1996). As células da cinta coriônica passam a secretar o eCG, aproximadamente, do dia 33 ao 120 da gestação (MCDOWELL; ADAMS; BAKER, 1993).

Essa gonadotrofina é formada por duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ), sendo a  $\alpha$  idêntica em todas as gonadotrofinas existentes (96 aminoácidos), e a  $\beta$  denota a diferença

---

<sup>2</sup> SCHAMS, S.; MENZER, C.; SCHALLENBERGER, E.; HOFFMAN, B.; HAHN, J.; HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: CONTROL OF REPRODUCTION IN THE COW, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, Luxembourg, p. 25-80, 1978.

entre elas (149 aminoácidos), ou seja, a cadeia  $\beta$  é responsável pela ação de cada gonadotrofina (COMBARNOUS, 1992). Na égua, o eCG estimula a formação de glândulas luteais acessórias para auxiliarem na manutenção da gestação (LUNN; VAGNANI; GINTHER, 1996).

Quando administrado em outras espécies, o eCG se liga aos receptores de FSH e de LH, sendo a única gonadotrofina capaz de se ligar simultaneamente a receptores de LH e FSH em mamíferos, exceto nos eqüinos (MURPHY; MARTINUK, 1991). Essa gonadotrofina apresenta prolongado tempo de ação nos bovinos (50 a 120 horas) devido a proporção de ácido siálico (10 a 15 %) presente na sua molécula (SCHAMS et al., 1978<sup>3</sup> apud KURAN; HUTCHINSON; BROADBENT, 1996, p. 10). A remoção do terminal siálico na cadeia de carboidratos diminui o tempo de ação do eCG (COMBARNOUS, 1992). Ainda, o eCG tem a capacidade de se ligar aos receptores de LH no CL (STEWART; ALLEN, 1981) levando a um aumento da produção de P4 (BARUSELLI, et al., 2001; BARUSELLI et al., 2004; MARQUES et al., 2003).

Devido a ação FSH do eCG, ele foi extensivamente utilizado a campo em programas de superovulação de doadoras e em diversos estudos com doadoras de embriões (BOLAND; GOULDING; ROCHE, 1991; ELSDEN, NELSON, SEIDEL, 1978; GOULDING et al., 1991; LOPEZ DA COSTA; CHAGAS E SILVA; ROBALO SILVA, 2001). Dessa forma o uso de eCG em programas de sincronização da ovulação para IATF e TETF têm sido cada vez maior no intuito de aumentar a eficiência desses programas.

---

<sup>3</sup> SCHAMS, S.; MENZER, C.; SCHALLENBERGER, E.; HOFFMAN, B.; HAHN, J.; HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: CONTROL OF REPRODUCTION IN THE COW, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, Luxembourg, p. 25-80, 1978.



Na sincronização da ovulação de receptoras de embrião, o eCG vem sendo utilizado na superestimulação ovariana para a formação de múltiplos CL, aumentando a taxa de aproveitamento e a concentração plasmática de P4 das receptoras.

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 embrionário (BARNES, 2000). A sincronização entre o embrião e o endométrio é regulada pela elevação pós-ovulatória da P4. É provável que tanto o momento da elevação da P4 como sua concentração na fase lútea sejam importantes para a manutenção da gestação (GOFF, 2002). Demonstrando esse fator, trabalho recente (HOMMEIDA; NAKAO; KUBOTA, 2004) acompanhou a curva de crescimento da P4 em vacas Holandesas após a IA e verificou efeito significativo do padrão de aumento da curva da P4 sobre a taxa de concepção. Animais que alcançaram 1 ng/ml de P4 após 5 dias da IA apresentaram reduzidas taxas de concepção (dia 6: 57%; dia 7: 40%; dia >7: 0%), comparados aos animais que tiveram um aumento até o dia 5 (85%).

As concentrações plasmáticas de P4 parecem ter correlação positiva com o reconhecimento materno da gestação em vacas. Mann, Lamming e Fray (1995) analisaram diariamente as concentrações plasmáticas de P4 durante 30 dias após a IA, tendo verificado que fêmeas que se tornaram gestantes apresentavam maiores concentrações de P4 que as não gestantes.

Assim, o mecanismo pelo qual a P4 mantém a prenhez é através do estímulo da produção de interferon- $\tau$  pelo concepto. Mann et al. (1999) demonstraram que vacas com alta concentração plasmática de P4 durante o período crítico, apresentam conceptos maiores e com maior capacidade de secretar interferon- $\tau$ .

Baixas concentração de P4 podem alterar as secreções do endométrio, resultando em baixas secreções de interferon- $\tau$  por um concepto subdesenvolvido. De fato Mann e Lamming (2001) recuperaram conceptos 16 dias após a IA e os classificaram como bem ou mal desenvolvidos. Observaram que baixas concentrações plasmáticas de P4 durante a fase luteínica, bem como o atraso na elevação da concentração plasmática de P4, estavam relacionadas com embriões mal desenvolvidos e com menor capacidade de secretar interferon- $\tau$ . Esse fato havia sido verificado por Geisert et al. (1988), que observaram que a suplementação da P4 endógena aumentou a taxa de crescimento dos embriões e, conseqüentemente, sua capacidade de secretar interferon- $\tau$ .

Kerbler et al. (1997) trataram novilhas com 1500 UI de hCG no dia 5 após a IA para induzir a ovulação do folículo dominante da segunda onda de crescimento folicular e a formação de um CL acessório com intuito de aumentar as concentrações plasmáticas de P4 durante o diestro. Verificaram que os embriões dos animais tratados apresentaram uma tendência de maior produção de interferon- $\tau$  que os dos animais não tratados. Os autores verificaram uma correlação positiva ( $r=0,6$ ;  $P < 0,05$ ) entre a área sob a curva da concentração plasmática de P4 durante o ciclo estral e a secreção de interferon- $\tau$  pelo concepto. O tratamento com hCG aumentou a P4 estatisticamente 8 dias após a IA.

Reis et al. (2004) compararam a concentração plasmática de P4 em novilhas receptoras de embrião no dia da inovulação (dia 7) com a subsequente taxa de concepção 30 dias após a TE. Observaram que animais que apresentavam a P4 plasmática entre 0 e 0,99 ng/ml apresentaram taxa de concepção de 39,2% (40/102)<sup>a</sup>; entre 1,00 e 1,99 ng/ml, de 44,6% (70/157)<sup>ab</sup>; entre 2,00 e 2,99 ng/ml, de

46,0% (52/113)<sup>ab</sup>; entre 3,00 e 3,99, de 55,7% (34/61)<sup>b</sup> e  $\geq$  4,00 ng/ml, de 52,3%(57/109)<sup>b</sup>, diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Ainda, Remsen e Roussel (1982) observaram que, quando as concentrações de P4 em receptoras de embrião estavam abaixo de 2,0 ng/ml, as taxas de prenhez eram de 20%, enquanto que concentrações de 2,0 a 5,0 ng/ml estavam relacionadas com taxas de 74%.

Esses achados estão de acordo com Niemann, Sacher e Elsaeser (1985) que obtiveram taxas de concepção de 51,1 % em receptoras de embriões bovinos descongelados quando a concentração plasmática de P4, no dia da inovulação não cirúrgica, estava entre 2 e 5 ng/ml; quando a P4 estava abaixo de 2 ng/ml as taxas de concepção foram de 35,3 %.

No entanto, outros autores não verificaram efeito benéfico de maiores concentrações plasmáticas de P4 sobre a taxa de concepção em receptoras de embrião (HASLER et al., 1980; NOGUEIRA et al., 2004; PAYAS et al., 1989; SPELL et al., 2001).

Fuentes e De La Fuente (1997) foram os primeiros a reportar que o tratamento com 1000 UI de eCG no dia 4 do tratamento com 17 $\beta$  estradiol e PRID<sup>®</sup> por 6,5 dias em novilhas Holandesas resultou em múltiplos CL (2 a 5 por ovário), maior ( $P < 0,05$ ) número de receptoras selecionadas para TE (89,7%) e maior taxa de prenhez (58,6%) quando comparados às novilhas sincronizadas com o mesmo tratamento sem eCG (49,1% e 22,2%, respectivamente). As receptoras tratadas com dose única de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (44,8% e 19,0%, respectivamente) ou que receberam um embrião 7 dias após o cio natural (50,0% e 28,8%, respectivamente) também apresentaram menor eficiência.

Em outro estudo (BARUSELLI et al., 2001), novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* foram tratadas com CIDR por 7,5 dias, combinado com 2 mg de BE e 50 mg de P4 IM no dia 0. Metade das novilhas receberam 800UI de eCG no dia 5 e todas receberam PGF<sub>2α</sub> no dia 7 e 1 mg de BE im no dia 8. O dia do estro foi considerado o dia 9. Todos animais foram examinados por ultra-sonografia 1 dia antes da TE e uma amostra de sangue foi colhida para determinação da concentração plasmática de P4. Os resultados revelaram que o tratamento com eCG aumentou (P<0,05) o número de ovulações (0,5 ± 0,5 vs. 2,6 ± 2,9 CL), a concentração plasmática de P4 (1,3 ± 0,8 vs. 4,2 ± 3,7 ng/ml), a taxa de aproveitamento [34,0 (17/50) vs. 84,0% (42/50)] e a taxa de prenhez [10,0 (5/50) vs. 42,0% (42/50)]. A taxa de concepção também apresentou um aumento numérico [29,4 (5/17) vs. 55,3% (21/38)], no entanto não foi estatisticamente significativo. É também digno de nota que, considerando apenas as receptoras com 1 CL, a área do CL (P<0,05) e a concentração plasmática de P4 (P<0,05) também foram maiores nas novilhas tratadas com eCG (2,9 ± 0,6 cm<sup>2</sup> e 2,3±1,6 ng/ml; n=8), que nas não tratadas (2,2±0,5 cm<sup>2</sup> e 1,3±0,8 ng/ml; n=17).

Tribulo et al. (2002) realizaram um posterior estudo para avaliar se uma menor dose de eCG também poderia aumentar as taxas de prenhez em receptoras inovuladas em tempo fixo. Vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* foram tratadas com DIB combinado com 2 mg de BE e 50 mg de P4 IM no dia 0. Metade das vacas receberam 400UI de eCG no dia 5 e todas receberam PGF<sub>2α</sub> no dia 5. O DIB foi retirado no dia 8 e 1mg de BE foi administrado no dia 9. Todas as vacas foram examinadas por ultra-sonografia um dia antes da TE. Embora esse tratamento não tenha resultado em muitas múltiplas ovulações como nos estudos anteriores, o tratamento com eCG aumentou (P<0,05) o diâmetro do CL (17,7 ± 0,4 vs. 18,5 ± 0,4

mm), a taxa de concepção [41,7 (53/127) vs. 57,6% (76/132)] e a taxa de prenhez [33,9 (53/156) vs. 48,7% (76/156)]. Em uma amostra de 55 receptoras inovuladas colheu-se sangue para determinação das concentrações plasmática de P4. A concentração plasmática de P4 em receptoras tratadas com eCG que apresentaram 2 ou 3 CLs ( $30,2 \pm 8,2$  ng/mL; n=8) ou apenas 1 CL ( $7,5 \pm 0,7$  ng/mL; n=18) no momento da TE foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que nas receptoras não tratadas com eCG ( $5,7 \pm 0,4$  ng/mL; n=29).

Apesar de pesquisas anteriores terem demonstrado a eficiência desse protocolo, os animais são manejados por, no mínimo, 4 vezes durante o tratamento. Estudos anteriores mostraram satisfatórias taxas de ovulação e aumento das concentrações plasmáticas de P4 em animais tratados com eCG no momento da retirada do dispositivo de P4 (BARUSELLI et al., 2004; MARQUES et al., 2003).

Dessa forma, um estudo recente foi realizado para tentar simplificar o protocolo, reduzindo o número de dias ou de injeções durante o tratamento (NASSER et al., 2004). Novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* receberam um DIB<sup>®</sup> e tiveram a emergência da nova onda de crescimento sincronizada com BE e P4. As novilhas foram tratadas com PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e 400UI de eCG no dia 5 ou no dia 8. O DIB<sup>®</sup> foi removido no dia 8 e administrou-se 1 mg de BE em todos os animais. No dia 17, todas as novilhas foram examinadas por ultra-sonografia e as consideradas aptas receberam um embrião produzido *in vitro*. O número de CL foi maior no grupo tratado com eCG no dia 5 ( $1,35 \pm 0,08$  vs.  $1,13 \pm 0,04$ ,  $P < 0,05$ ). A taxa de aproveitamento [dia 5: 89,4 (135/151) vs. dia 8: 84,7% (127/150)] e de concepção [dia 5: 52,6 (71/135) vs. dia 8: 48,0% (61/127)] foram estatisticamente semelhantes. No entanto, a taxa de prenhez apresentou tendência ( $P = 0,1$ ) de melhores resultados em novilhas tratadas com eCG no dia 5 [dia 5: 47,0 (71/151) vs. dia 8: 40,7%

(61/150)]. Em um grupo de 154 receptoras foi determinada a concentração plasmática de P4 no dia da TE (dia 7). O tratamento com eCG no dia 5 resultou em maior concentração plasmática de P4 ( $2,4 \pm 0,3$  vs.  $1,7 \pm 0,2$  ng/ml). Nesse grupo de receptoras verificou-se maior taxa de concepção ( $P < 0,05$ ) nos animais tratados com eCG no dia 5 [55, 8 (43/77) vs. 41,6% (32/77)].

## 2.5 MORTALIDADE EMBRIONÁRIA E FETAL

A eficiência da propriedade rural depende da eficiência reprodutiva de seus animais. No caso de leite, a quantidade de leite/ano da propriedade, e de corte, o número de bezerros nascidos por ano. As perdas embrionária/fetais podem ter efeitos devastadores sobre essa eficiência. Os animais são diagnosticados como gestantes em torno do dia 40 de gestação, e pouca atenção se emprega a partir de então até momentos próximos ao parto, ao menos que hajam sinais evidentes de perdas gestacionais.

O advento da ultra-sonografia e outros métodos para detecção precoce da gestação propiciaram a caracterização do momento das perdas gestacionais em bovinos. Segundo o Comitê de Nomenclaturas Reprodutivas em Bovinos<sup>4</sup> (1972 apud LOPEZ-GATIUS et al., 2002, p. 1252) o período embrionário estende-se da concepção ao final do período de diferenciação (em torno de 42 dias), e o período fetal estende-se do dia 42 ao parto.

---

<sup>4</sup> Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. **Cornell Veterinarian**, v. 62, p. 216-237, 1972.

Diversos fatores influenciam a mortalidade embrionária/fetal como o manejo, idade do animal, lactação e procedência do embrião (SARTORI, 2004). Em bovinos acasalados por IA ou por monta natural relatam-se perdas do diagnóstico ao parto de 5 a 6 % (DUNNE; DISKIN; SREENAN, 2000) chegando a 10% (LOPEZ-GATIUS et al., 2002).

Resultados apresentados em Santos et al. (2004) mostraram uma perda detectada por ultra-sonografia de 4,2% das gestações em novilhas de corte primigravídicas entre 30-35 e 60-90 dias de gestação. Em novilhas de leite, Dunne, Diskin e Sreenan (2000) também relataram perdas de 4,2 % entre o diagnóstico aos 30 dias e o término da gestação. No entanto, Rivera, Lopez e Fricke (2004) mostraram perdas muito mais elevadas (10,2%) entre 30 e 75 dias de gestação. Em vacas de leite de alta produção estressadas esse índice pode chegar a 42,7% entre 27-30 e 40-50 dias (CARTMILL et al., 2001).

Na TE esse fator torna-se mais importante pelos maiores índices de perdas relatados, principalmente em gestações resultantes de transferência de embriões produzidos *in vitro*, os quais possuem padrões de expressão gênica completamente diferentes dos produzidos *in vivo* (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000). Perdas econômicas causadas por perdas embrionárias/fetais são substanciais, não somente pelo feto abortado, mas pela genética, custos da biotecnologia empregada e período em aberto da fêmea (JONKER, 2004).

Em gestações resultantes de TE produzidos *in vivo*, Zanenga e Pedroso (1995) relataram perdas gestacionais entre 23-30 e 53-60 dias de 4,4 %. Esse índice é baixo comparado a Sartori et al. (2003), que avaliaram as perdas embrionárias/fetais entre 25-32 a 60-66 em vacas de leite de alta produção criadas

nos Estados Unidos. Os animais foram submetidos a TE de embriões produzidos *in vivo* e encontrou-se perdas de 26,2 %.

Na transferência nuclear existe o relato de grandes perdas gestacionais, não comuns a gestações normais (edema de placenta, hipertensão pulmonar crônica, hidroalantóide, síndrome do gigantismo). Mello (2003) obteve 9 gestações bovinas aos 30 dias, chegando 7 aos 90 dias. No entanto, apenas 2 animais nasceram viáveis, mostrando o alto índice de perdas gestacionais até o nascimento.

O CL é a principal fonte de produção de P4 na fêmea bovina gestante, e o embrião e o feto são dependentes da P4 luteínica por no mínimo 200 dias de gestação (NISWENDER et al., 2000). O papel da P4 nas perdas embrionárias entre a primeira e a terceira semana de gestação foi extensivamente estudada. No entanto, poucos estudos analisaram o CL e a manutenção da gestação a partir do diagnóstico. Foi relatada uma associação positiva entre CL adicionais e a manutenção da gestação entre os dias 38 e 90: animais com CL adicionais tinham 8,3 vezes menos chance de perder a gestação que animais com CL único (LOPEZ-GATIUS et al., 2002).

Em um grande estudo (LÓPEZ-GATIUS et al., 2004), 1098 gestações em vacas de leite foram diagnosticadas nos dias 36-42 de gestação e confirmadas no dia 90. Os animais gestantes foram distribuídos em dois grupos experimentais. O grupo controle não recebeu tratamento algum, enquanto nos animais do grupo tratado foi inserido um PRID por 28 dias com o objetivo de suprir concentrações plasmáticas de P4 sub-ótimas durante o período embrionário tardio e o fetal inicial, diminuindo as perdas embrionárias/fetais nesse período. Os autores obtiveram 95 perdas (8,7%): 66 (12%) no grupo controle e 29 (5,3%) no grupo tratado. O grupo



tratado apresentou 2,4 vezes menos chance de perder a gestação que o grupo controle.

No entanto, um trabalho recente (NOGUEIRA et al., 2004) não verificou efeito do número de CL e da concentração plasmática de P4 sobre as perdas embrionárias/fetais entre 21 e 83 dias de gestação em receptoras de embriões bovinos superovuladas com eCG. Os animais com P4 de  $3,93 \pm 0,73$  ng/ml e 0,82 CL apresentaram 5,3% (1/18) de perdas;  $4,24 \pm 0,43$  ng/ml e 1,07 CL, 5,9% (1/16);  $5,95 \pm 0,41$  ng/ml e 1,16 CL, 0% (0/11); e  $7,81 \pm 0,61$  ng/ml e 1,68 CL, 18,2% (2/9). Os resultados ainda mostram controvérsias sobre esse assunto e essa área apresenta-se como uma área promissora para pesquisas futuras.

### 3 HIPÓTESE DO TRABALHO

Este trabalho testa a hipótese de que, no protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal contendo progesterona para transferência de embriões em tempo fixo, a administração de eCG no dia 8 do tratamento apresenta resultados semelhantes ao tratamento com eCG no dia 5. Verifica ainda, que a administração de reduzidas doses de eCG são suficientes para se obter a mesma eficiência.

#### 4 OBJETIVOS

- Determinar o momento mais apropriado para a administração de eCG no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo;
- Adequar a dosagem de eCG no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo;
- Verificar as concentrações plasmáticas de progesterona de acordo com o tratamento;
- Mensurar a mortalidade embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação de acordo com as concentrações plasmáticas de progesterona e com o número de corpos lúteos no dia da inovulação.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Fazenda Sonho Real, localizada no município de Terenos – MS distante 70 Km de Campo Grande – MS, que já adotava rotineiramente programas de transferência de embriões, apresentando instalações compatíveis com a técnica.

Foram utilizadas 594 novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* sem prévio serviço com idade entre 20 e 30 meses e escore de condição corporal médio de  $3,36 \pm 0,01$  (escala 1-5). As raças predominantes nos cruzamentos eram Nelore com: Simental, Angus e Brangus. Os animais foram previamente submetidos a exame ultrassonográfico para detecção de ciclicidade, apresentavam-se livre de Brucelose e Tuberculose e estavam devidamente vacinados contra Leptospirose, Aftosa, Clostridioses, IBR, BVD, PI3 e BRSV. Todos os animais eram suplementados com sal mineral de boa qualidade e água *ad libitum*.



Figura 1 – Novilhas receptoras de embrião utilizadas no experimento. Terenos – MS, 2003

## 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados. Os 4 blocos apresentaram quantidades de animais semelhantes em cada tratamento. A raça predominante das receptoras, o escore de condição corporal, os acasalamentos e o estágio de desenvolvimento embrionário foram levados em consideração para uma divisão equitativa dos grupos experimentais.

### 5.3 TRATAMENTOS

Ao início de cada réplica os animais foram distribuídos homoganeamente em 6 grupos experimentais (fatorial 3x2) de acordo com escore de condição corporal e raça. Em dia aleatório do ciclo estral (dia 0) todas novilhas foram tratadas com um dispositivo intravaginal contendo P4<sup>1</sup> e 2,0 mg de BE associados a 50,0 mg de P4 IM<sup>2</sup>. A partir desse momento os animais foram divididos para receberem 0,15 mg de d-cloprostenol<sup>3</sup> IM (PGF<sub>2α</sub>) e 400, 500 ou 600 UI de eCG<sup>4</sup> IM na manhã do dia 5 (Grupos G-400d5, n=101; G-500d5, n=98; e G-600d5, n=100) ou na manhã do dia 8 (Grupos G-400d8, n=100; G-500d8, n=99; e G-600d8 n=96). Os dispositivos foram removidos na manhã do dia 8 e 1 mg de BE<sup>2</sup> IM foi administrado na manhã do dia 9. O dia 10 foi considerado o dia do estro. No dia 17 foi inovulado um embrião produzido *in vitro* nos animais aptos à TE, sem a observação de sintomatologia de estro. Os grupos experimentais estão descritos na tabela 1.

---

<sup>1</sup> DIB<sup>®</sup>, Syntex, Argentina.

<sup>2</sup> Index Farmacêutica, Brasil.

<sup>3</sup> Prolise<sup>®</sup>, ARSA, Argentina.

<sup>4</sup> Novormon<sup>®</sup>, Syntex, Argentina.

Tabela 1 – Grupos experimentais do presente experimento de acordo com a dose e com o momento de administração de eCG. Terenos – MS, 2003

<b>GRUPO</b>	<b>DOSE (UI)</b>	<b>DIA</b>
G-400d5	400	5
G-500d5	500	5
G-600d5	600	5
G-400d8	400	8
G-500d8	500	8
G-600d8	600	8

#### 5.4 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

No dia 17 foi realizada a ultra-sonografia dos ovários direito e esquerdo em todos os animais para avaliar a presença, diâmetro e quantidade de CL. O aparelho utilizado (B-mode) era munido de transdutor linear transretal de 5,0 Mhz<sup>5</sup>. A visualização ovariana foi obtida posicionando-se o transdutor em diferentes planos até que o maior diâmetro do CL fosse visualizado, quando então, era classificado de acordo com o seu diâmetro (CL 18 – 18,0 a 19,9 mm; CL 20 – 20,0 a 21,9 mm; CL 22 - >22,0 mm). Nos animais superovulados era realizada a verredura da superfície ovariana para contagem do número de CL. As novilhas que apresentaram CL único  $\geq 18$  mm de diâmetro ou mais que 1 CL foram consideradas aptas a receberem um embrião. Essas receptoras foram examinadas aos 30 e 60 dias de gestação para o diagnóstico de gestação e sexagem fetal, respectivamente.

<sup>5</sup> Aloka SSD 500 – Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japão.

## 5.5 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

No dia da avaliação ultra-sonográfica, em um grupo de animais (n=222) foram colhidas amostras de sangue por punção da veia caudal, em tubos de vácuo de 10 ml contendo heparina<sup>6</sup>. Após a colheita, as amostras permaneciam refrigeradas até o momento que fossem centrifugadas a 823 g por 15 minutos<sup>7</sup> para separação do plasma. Este 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 P4 foram realizadas por radioimunoensaio (RIE)<sup>8</sup> no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). A sensibilidade de detecção do teste foi de 0,0076 ng/ml, e o coeficiente de variação intra e interensaio foram inferiores a 10%. A figura 2 resume o experimento descrito anteriormente.

---

<sup>6</sup> Vacutainer®, Becton Dickinson & Company, EUA.

<sup>7</sup> Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®, Brasil.

<sup>8</sup> Progesterone Coat-A-Count®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA.



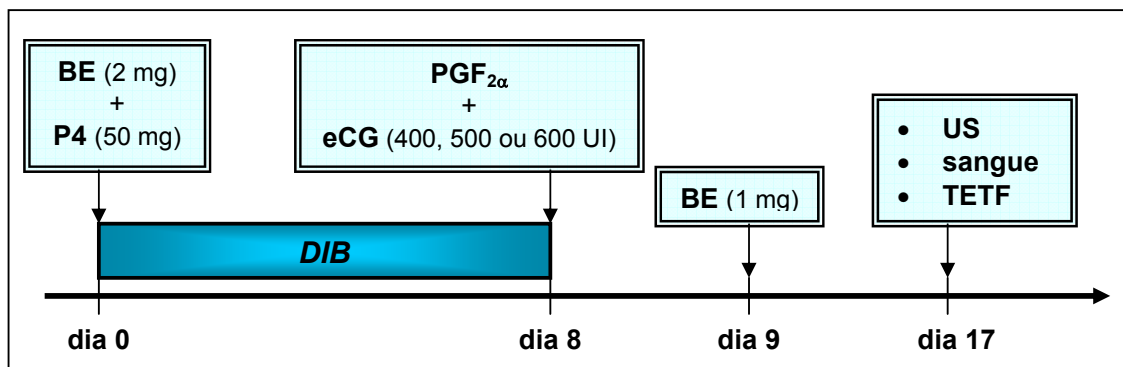
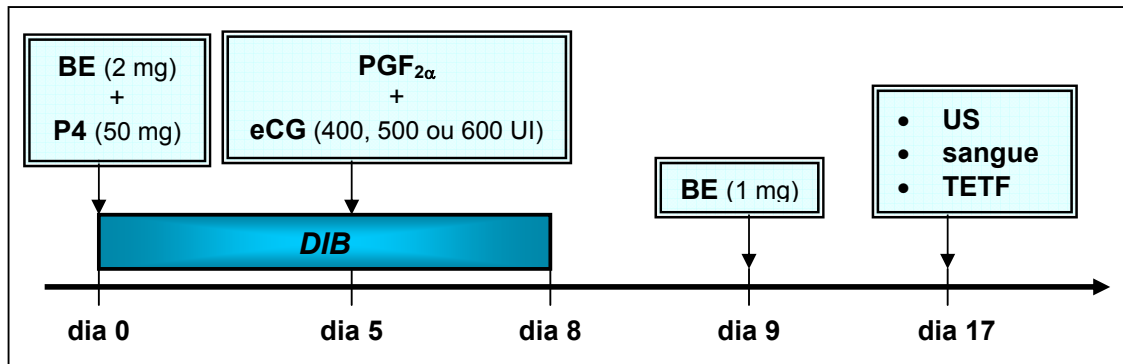


Figura 2 – Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados nas receptoras para transferência de embriões em tempo fixo

## 5.6 PRODUÇÃO DOS EMBRIÕES

Os embriões (Figura 3) foram produzidos *in vitro* por uma empresa comercial brasileira<sup>9</sup> com protocolo previamente descrito (DAYAN et al., 2002). Apenas embriões de qualidade I foram utilizados no experimento. Todos os embriões foram transferidos pelo mesmo veterinário para se evitar variações quanto ao procedimento da técnica de TE.

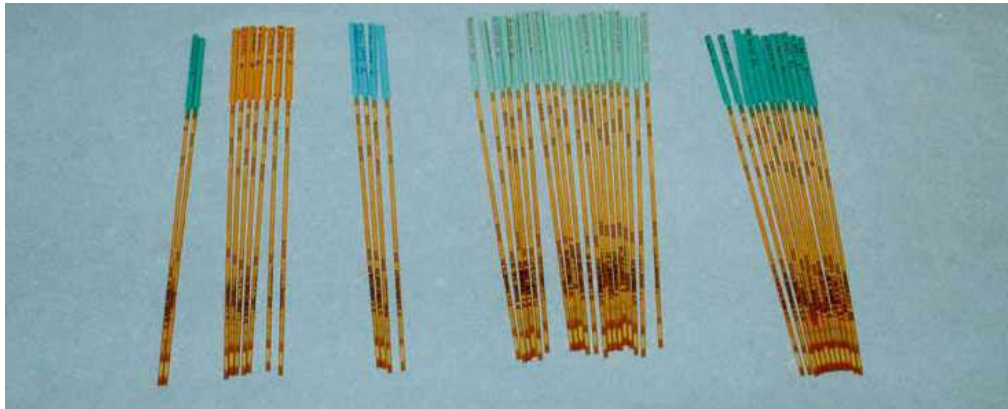


Figura 3 – Embriões utilizados no experimento. Terenos – MS, 2003

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram obtidos pelo programa SAS System for Windows (Statistical Analyses System, 2000). Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das

---

<sup>9</sup> Vitrogen Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução Animal S/C Ltda.

variâncias. Caso não obedecessem às premissas, eram 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 a 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 transformados, quando necessária a transformação; e dos analisados pela análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis. As variáveis resposta binomiais foram descritas pelas suas proporções (porcentagens).

O nível de significância 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 para uma determinada variável resposta. Para nível de significância de 0,05 até 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

Na variável número de CL em todos os animais, 2 receptoras do grupo G-400d5, 2 do G-500d5, 1 do G-600d5, 1 do G-400d8 e 1 do G-600d8 foram removidas das análises por se comportarem como outliers. Mesmo procedimento foi adotado na variável número de CL nos animais selecionados para determinação da concentração plasmática de P4 em 1 receptora do grupo G-400d5, 1 do G-500d5 e 1 do G-400d8. Para a variável concentração plasmática de P4 no dia da inovulação, mesmo procedimento adotou-se para 1 animal do G-400d5, 1 do G-500d5, 1 do G-600d5 e 1 do G-600d8.

A variável resposta concentração plasmática de P4 não obedeceu a normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida pela transformação para função logarítmica na base 10 de seus valores. O valor transformado da concentração plasmática de P4 e a variável número de CL no momento da inovulação foram analisadas pelo procedimento ONEWAY ANOVA.

As variáveis resposta taxa de aproveitamento, taxa de concepção, taxa de prenhez, classificação do CL e perda embrionária/fetal foram analisadas pelo procedimento NPAR1WAY.

## 6 RESULTADOS

Não se observou interação estatística entre blocos e tratamentos ( $P>0,05$ ) e entre dose e dia ( $P>0,05$ ) sobre as variáveis apresentadas. Os efeitos dos tratamentos sobre a taxa de aproveitamento, de concepção, de prenhez e número de CL estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 – Taxa de aproveitamento, de concepção, de prenhez e número de CL em receptoras de embrião bovino tratadas com dispositivo intravaginal contendo P4 associado a 2 mg de BE e 50 mg de P4 no dia 0, PGF<sub>2α</sub> e eCG no dia 5 ou 8, 1 mg de BE no dia 9 e involuadas dia 17. Terenos – MS, 2003

Dose	Dia	N	Taxa de aproveitamento (%)	Taxa de concepção (%)	Taxa de prenhez (%)	Número de corpos lúteos
400	5	101	81,2 (82/101) <sup>b</sup>	58,0 (47/81) <sup>a</sup>	46,5 (47/101) <sup>a</sup>	1,24 ± 0,05 <sup>bc</sup>
	8	100	83,0 (83/100) <sup>b</sup>	45,8 (38/83) <sup>ab</sup>	38,0 (38/100) <sup>ab</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>c</sup>
500	5	98	86,7 (85/98) <sup>ab</sup>	48,8 (40/82) <sup>ab</sup>	40,8 (40/98) <sup>ab</sup>	1,54 ± 0,11 <sup>b</sup>
	8	99	80,8 (80/99) <sup>b</sup>	39,2 (31/79) <sup>b</sup>	31,3 (31/99) <sup>b</sup>	1,11 ± 0,05 <sup>c</sup>
600	5	100	93,0 (93/100) <sup>a</sup>	48,9 (45/92) <sup>ab</sup>	45,0 (45/100) <sup>ab</sup>	2,37 ± 0,21 <sup>a</sup>
	8	96	81,3 (78/96) <sup>b</sup>	50,0 (39/78) <sup>ab</sup>	40,6 (39/96) <sup>ab</sup>	1,17 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>Efeitos principais</b>						
	5	299	87,0 (260/299) <sup>a</sup>	51,8 (132/255) <sup>x</sup>	44,1 (132/299) <sup>a</sup>	1,74 ± 0,09 <sup>a</sup>
	8	295	81,7 (241/295) <sup>b</sup>	45,0 (108/240) <sup>y</sup>	36,6 (108/295) <sup>b</sup>	1,13 ± 0,03 <sup>b</sup>
400		201	82,1(165/201)	51,8 (85/164)	42,3 (85/201)	1,17 ± 0,03 <sup>b</sup>
500		197	83,8 (165/197)	44,1 (71/161)	36,0 (71/197)	1,33 ± 0,06 <sup>b</sup>
600		196	87,2 (171/196)	49,4 (84/170)	42,9 (84/196)	1,82 ± 0,12 <sup>a</sup>

As médias ou proporções nas colunas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b  $P<0,05$ ; x,y  $P=0,07$ )

Os efeitos principais são indicativos de que a administração de eCG no dia 5 do tratamento apresenta taxa de aproveitamento estatisticamente superior ( $P < 0,05$ ) à administração no dia 8. Ainda, de que as doses de eCG empregadas apresentam taxas de aproveitamento semelhantes ( $P > 0,05$ ).

A taxa de concepção dos animais que receberam eCG no dia 5 do tratamento apresentou tendência a ser superior que nos tratados com eCG no dia 8 ( $P = 0,07$ ). Não se observou diferença estatística entre as doses sobre a taxa de concepção ( $P > 0,05$ ).

A taxa de prenhez dos animais que receberam eCG no dia 5 do tratamento foi superior a dos animais tratados com eCG no dia 8 ( $P < 0,05$ ). Não se observou diferença estatística entre as doses sobre a taxa de prenhez ( $P > 0,05$ ).

A administração de eCG no dia 5 induziu a formação de um maior número de CL que a administração no dia 8 ( $P < 0,05$ ). Ainda, a administração de 600 UI de eCG levou à formação de maior número de CL que as de 400 e 500 UI ( $P < 0,05$ ). Não se observou diferença quanto ao número de CL entre 400 e 500 UI ( $P > 0,05$ ).

As figuras 4a e 4b apresentam imagens ultra-sonográficas, no dia da inovulação, de ovários de animais superestimulados, no entanto sem a ocorrência de ovulações. As figuras 4c e 4d mostram ovários superovulados.

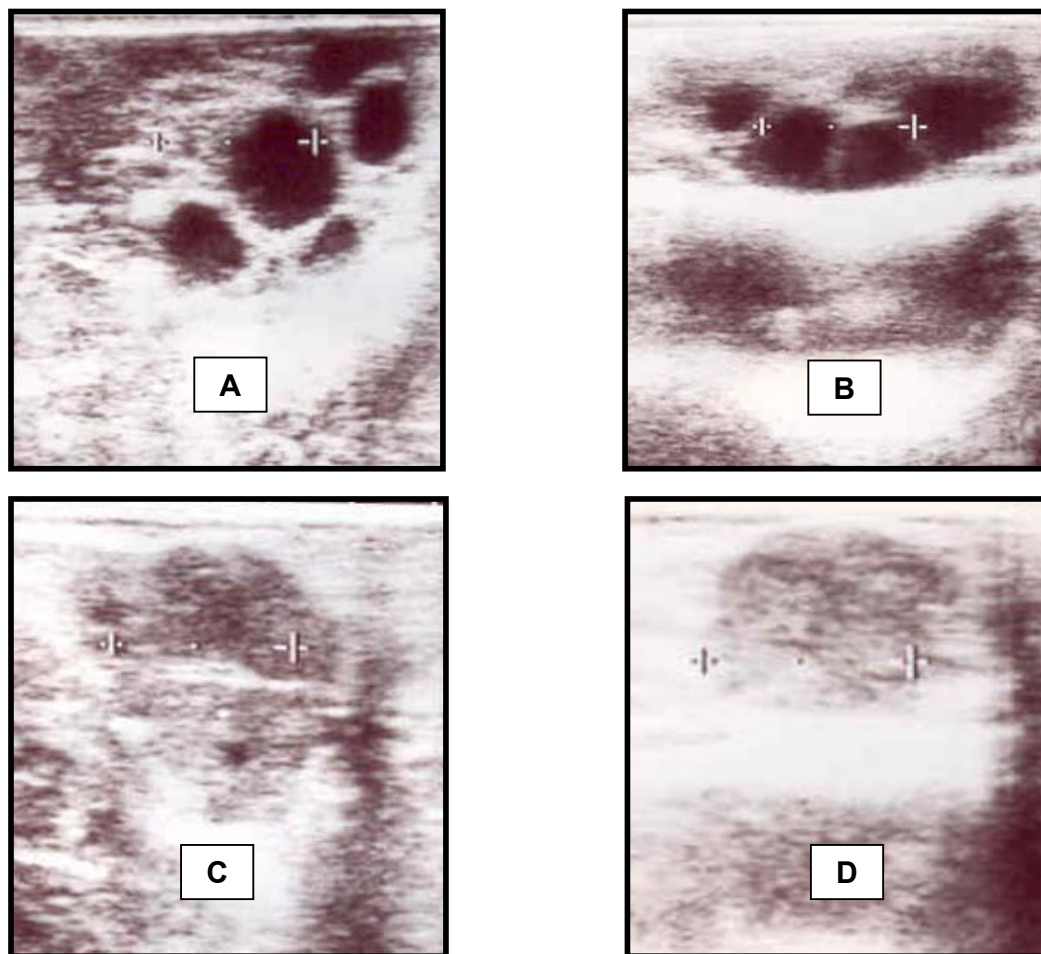


Figura 4 – Imagens ultra-sonográficas, no dia da inovulação, ilustrando ovários superestimulados sem ocorrência de ovulações (A e B) e superovulados (C e D)

No grupo de receptoras em que foi determinada a concentração plasmática de P4 no dia da inovulação, não se observou interação estatística entre dose e dia ( $P > 0,05$ ) sobre as variáveis apresentadas. A tabela 3 mostra o número de CL e a concentração plasmática de P4 nesses animais.

Tabela 3 – Número de CL e concentração plasmática de P4 em receptoras de embrião bovino tratadas com dispositivo intravaginal contendo P4 associado a 2 mg de BE e 50 mg de P4 no dia 0, PGF<sub>2α</sub> e eCG no dia 5 ou 8, 1 mg de BE no dia 9 e inovuladas dia 17. Terenos – MS, 2003

Dose	Dia	N	Número de corpos lúteos	Concentração plasmática de P4 (ng/ml)
400	5	36	1,26 ± 0,09 <sup>bc</sup>	3,53 ± 0,34 <sup>bc</sup>
	8	39	1,05 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,45 ± 0,26 <sup>c</sup>
500	5	37	1,58 ± 0,15 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,69 <sup>b</sup>
	8	36	1,06 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,56 ± 0,29 <sup>c</sup>
600	5	38	2,18 ± 0,27 <sup>a</sup>	6,10 ± 0,98 <sup>a</sup>
	8	36	1,06 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,20 ± 0,34 <sup>bc</sup>
<b>Efeitos principais</b>				
	5	111	1,69 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,68 ± 0,43 <sup>a</sup>
	8	111	1,06 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,73 ± 0,17 <sup>b</sup>
400		75	1,15 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,96 ± 0,22 <sup>b</sup>
500		73	1,33 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,45 ± 0,38 <sup>b</sup>
600		74	1,65 ± 0,16 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,55 <sup>a</sup>

As médias ou proporções nas colunas com letras sobscritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05)

Os efeitos principais são indicativos de que a administração de eCG no dia 5 induz a formação de maior número de CL que a administração no dia 8 (P<0,05). Ainda, de que a administração de 600 UI de eCG induz a formação de maior número de CL que a administração de 400 e 500 UI.

A administração de eCG no dia 5 resultou em maiores concentrações plasmáticas de P4 que no dia 8 (P<0,05). Ainda, o uso de 600 UI apresentou



maiores concentrações plasmáticas de P4 que 400 e 500 UI ( $P < 0,05$ ), sendo estes semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ).

Não se observou interação estatística entre dose e dia ( $P > 0,05$ ) sobre a frequência de animais nas classificações do CL único. Os efeitos principais sobre essa variável estão demonstrados nos gráficos 1 e 2.

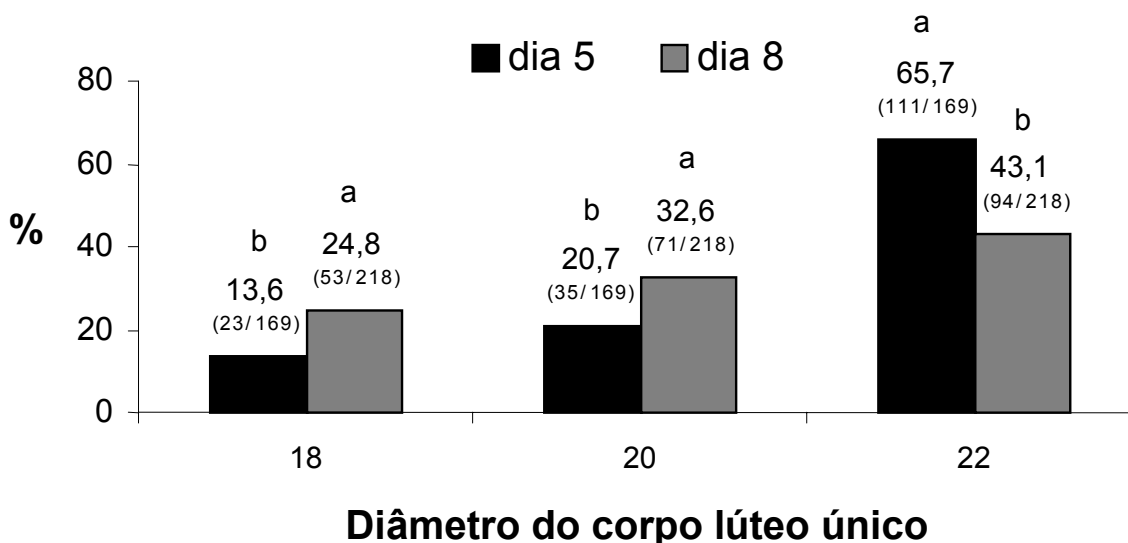


Gráfico 1 – Frequência dos animais de acordo com a classificação de CL único e com o dia de administração de eCG. Terenos – MS, 2003 (colunas na mesma classificação com letras sobscritas diferentes apresentam diferença estatística,  $P < 0,05$ )

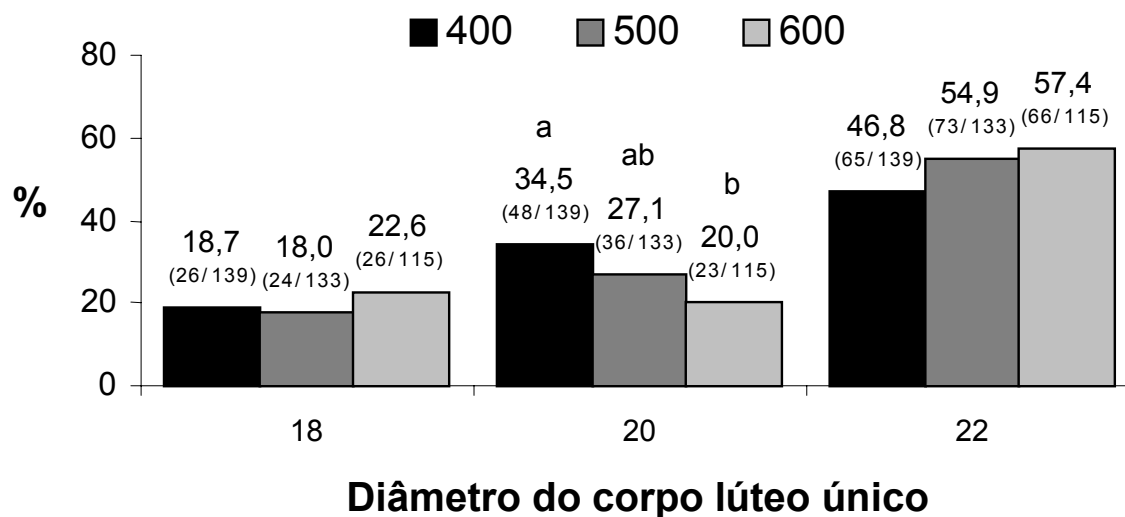


Gráfico 2 – Frequência dos animais de acordo com a classificação de CL único e com a dose de eCG administrada. Terenos – MS, 2003 (colunas na mesma classificação com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística,  $P < 0,05$ )

A tabela 4 mostra a proporção de animais superovulados, bem como a distribuição em cada grupo.

Tabela 4 – Porcentagem de superovulação e frequência dos animais de acordo com o número de CL em cada grupo experimental. Terenos – MS, 2003

Dose	Dia	N	Corpos lúteos (%)				Animais superovulados (%)
			1	2	3	> 3	
400	5	82	76,8 (63)	18,3 (15)	2,4 (2)	2,5 (2)	23,2 (19/82) <sup>b</sup>
	8	83	91,6 (76)	4,8 (4)	2,4 (2)	1,2 (1)	8,4 (7/83) <sup>c</sup>
500	5	85	69,4 (59)	15,3 (13)	5,9 (5)	9,4 (8)	30,6 (26/85) <sup>b</sup>
	8	80	92,5 (74)	3,7 (3)	3,8 (3)	0 (0)	7,5 (6/80) <sup>c</sup>
600	5	93	50,5 (47)	17,2 (16)	10,8 (10)	21,5 (20)	49,5 (46/93) <sup>a</sup>
	8	78	87,2 (68)	6,4 (5)	5,1 (4)	1,3 (1)	12,8 (10/78) <sup>c</sup>
<b>Efeitos principais</b>							
	5	260	65,0 (169)	17,0 (44)	6,5 (17)	11,5 (30)	35,0 (91/260) <sup>a</sup>
	8	241	90,5 (218)	5,0 (12)	3,7 (9)	0,8 (2)	9,5 (23/241) <sup>b</sup>
400		165	84,2 (139)	11,6 (19)	2,4 (4)	1,8 (3)	15,8 (26/165) <sup>b</sup>
500		165	80,6 (133)	9,7 (16)	4,9 (8)	4,8 (8)	19,4 (32/165) <sup>b</sup>
600		171	67,3 (115)	12,3 (21)	8,2 (14)	12,2 (21)	32,7 (56/171) <sup>a</sup>

As proporções nas colunas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05)

Observou-se maior porcentagem de animais superovulados quando o eCG foi administrado no dia 5 (P<0,05). A dose de 600 UI de eCG induziu a superovulação em uma maior porcentagem de animais, comparada à de 400 e 500 UI (P<0,05), sendo estas semelhantes entre si (P>0,05).

Não foi verificada interação estatística entre acasalamento e número de CL (P>0,05); entre estágio de desenvolvimento embrionário e número de CL (P>0,05); entre acasalamento e concentração plasmática de P4 no dia da inovulação (P>0,05); entre estágio de desenvolvimento embrionário e concentração plasmática de P4 no dia da inovulação (P>0,05) sobre as perdas embrionárias/fetais. Assim criaram-se

variáveis aleatórias para mostrar as perdas gestacionais de acordo com o número de CL e com a concentração plasmática de P4 (Gráficos 3, 4 e 5).

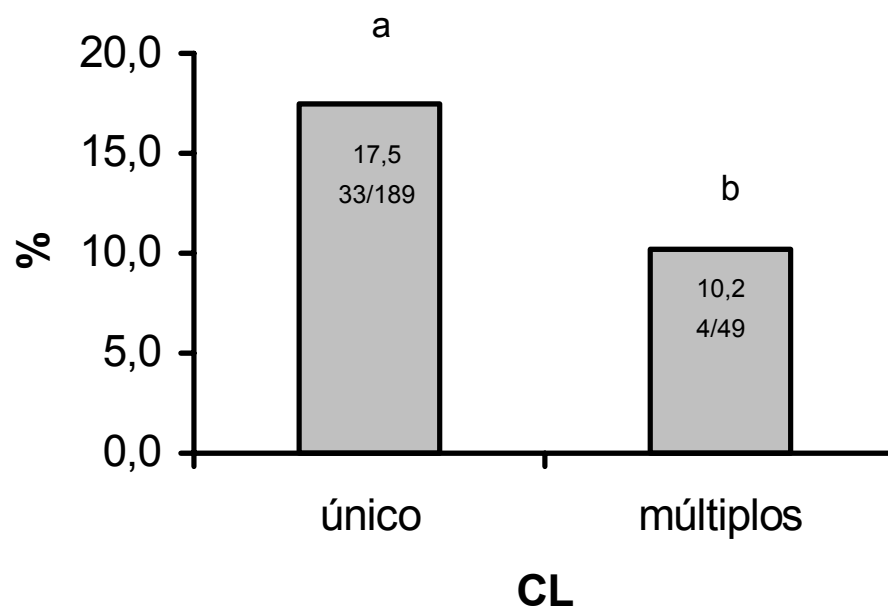


Gráfico 3 – Efeito da ovulação única e da superovulação em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003. Terenos – MS, 2003 (colunas com letras sobrescritas diferentes,  $P=0,0547$ )

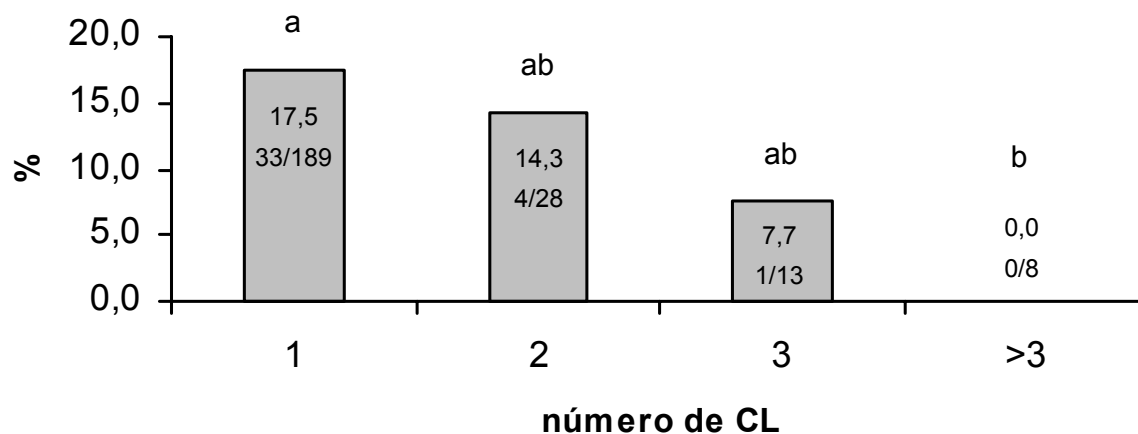


Gráfico 4 – Efeito do número de CL em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003 (colunas com letras sobrescritas diferentes,  $P=0,0976$ )

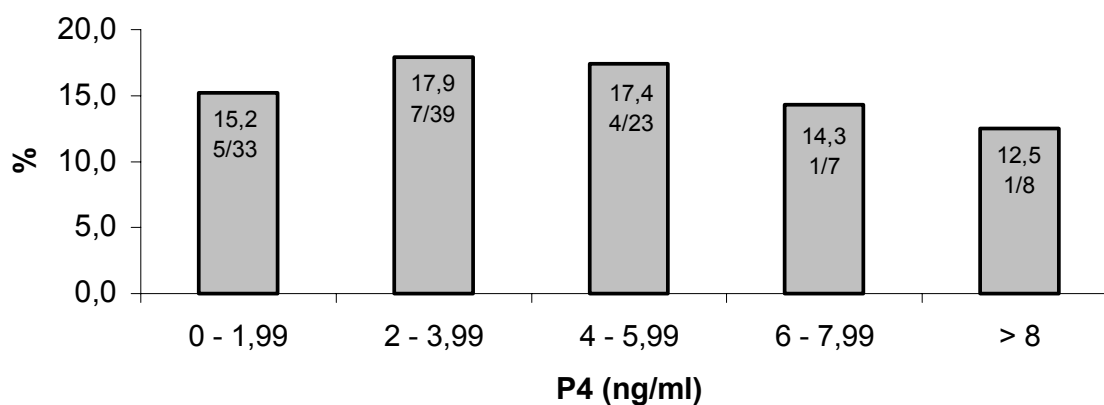


Gráfico 5 – Efeito da concentração plasmática de P4 no dia da inovação em receptoras de embrião bovino sobre a perda embrionária/fetal entre 30 e 60 dias de gestação. Terenos – MS, 2003

O gráfico 3 mostra que as receptoras que apresentavam mais que um CL no dia da inovulação tiveram uma tendência de menores perdas embrionárias/fetais entre 30 e 60 dias de gestação ( $P=0,0547$ ). Estratificando as superovulações, verifica-se no gráfico 4 que animais com mais de 3 CL apresentaram uma tendência ( $P=0,0976$ ) de menores perdas.

No gráfico 5, apesar da redução numérica, não verificou-se efeito da concentração plasmática de P4 no dia da inovulação sobre as perdas embrionárias/fetais.

## 7 DISCUSSÃO

No presente experimento verificou-se que receptoras sincronizadas com dispositivo intravaginal contendo P4 associado ao eCG apresentaram altas taxas de aproveitamento (acima de 80%) em todos os grupos experimentais. Os estudos existentes na literatura, com a adição de eCG no protocolo a base de P4 para sincronização de receptoras, também relatam taxas de aproveitamento semelhantes às encontradas nessa investigação (BARUSELLI et al., 2001; FUENTES; DE LA FUENTE, 1997; MORENO et al., 2003; NASSER et al., 2004; TRÍBULO et al., 2002).

As receptoras tratadas com eCG no dia 5 apresentaram maior taxa de aproveitamento que as tratadas no dia 8. A administração de eCG no início da onda de crescimento folicular (dia 5) faz com que os folículos cresçam sob a estimulação de FSH e de LH, uma vez que o eCG permanece na corrente sanguínea por até 120 h e se liga aos receptores foliculares de FSH e de LH (MURPHY; MARTINUK, 1991). Assim, animais que apresentariam um *turn-over* folicular antes da indução da ovulação, mantiveram o crescimento dos folículos até o final do tratamento. No grupo que recebeu eCG no dia 8, provavelmente, alguns animais apresentaram regressão do folículo dominante antes da administração de eCG, levando a uma menor taxa de ovulação e de aproveitamento.

Essa justificativa também pode explicar a menor taxa de aproveitamento, apesar de apenas numérica, encontrada por Nasser et al. (2004) em animais que receberam eCG no dia 8 do tratamento com dispositivo intravaginal contendo P4 quando comparados aos animais tratados no dia 5 (84,7 vs. 89,4%).

Não se observou efeito de dose de eCG administrada sobre a taxa de aproveitamento das receptoras. Dessa forma, o tratamento com 400 UI de eCG se mostrou eficiente para atingir satisfatórias taxas de aproveitamento, reduzindo os custos do protocolo de sincronização.

Na literatura não foram encontrados trabalhos comparando doses de eCG para a sincronização de receptoras com dispositivo contendo P4. No entanto, nos trabalhos publicados verificam-se taxas de aproveitamento semelhantes, apesar da discrepância entre as doses utilizadas. Fuentes e De La Fuente (1997), utilizaram 1000 UI e encontraram 89,7% de taxa de aproveitamento; Baruselli et al. (2001), empregaram 800 UI e verificaram 84%; Tríbulo et al. (2002) trataram as receptoras com 400 UI e relataram 84,6%; Nasser et al. (2004), utilizaram 400 UI e observaram 87,0%, sugerindo que a dose de 400 UI de eCG é suficiente para se alcançar elevadas taxas de aproveitamento.

Nogueira et al. (2004) compararam doses de eCG em um protocolo com observação de estro para indução de superovulação de receptoras de embrião. No dia 0 as receptoras foram tratadas com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e detectadas em estro após 2 a 7 dias, sendo tratadas com 0, 200, 400 ou 600 UI de eCG no dia 14. Receberam outra aplicação de agente luteolítico no dia 16 e foram submetidas a detecção de estro do dia 18 ao 22. As taxas de aproveitamento (animais aptos à TE/animais tratados com eCG) não diferiram (0 = 58,1 %; 200 = 52,5 %; 400 = 58,7 %; e 600 = 57,3 %) de acordo com a dose de eCG empregada. A detecção de estro pode ter comprometido a taxa de aproveitamento em todos os grupos, pois na literatura foi relatado que animais com sangue *Bos indicus* apresentam estro de duração curta, quando comparados a *Bos taurus* (MIZUTA, 2003), e elevado percentual de manifestação durante o período noturno (PINHEIRO et al., 1998).



A taxa de concepção apresentou tendência a ser superior nas receptoras que receberam eCG no dia 5. Dois mecanismos podem ter proporcionado esse aumento, sendo ambos relacionados com a elevação da concentração plasmática de P4 durante o diestro, a qual foi superior nos animais tratados com eCG no dia 5.

Primeiro, elevadas concentrações de P4 no ciclo subsequente à ovulação levam à redução do diâmetro do folículo dominante da segunda onda de crescimento (ADAMS; MATTERI; GINTHER,1992; BERGFELT; KASTELIC; GINTHER, 1991; LUCY et al., 1992), em virtude da diminuição da frequência dos pulsos de liberação de LH (FIKE et al., 2004; NETT et al., 2002; SANCHEZ et al., 1995). Assim, menores concentrações de estradiol - menor diâmetro do folículo dominante da segunda onda - levariam ao atraso no mecanismo de luteólise. A diminuição do estradiol durante o diestro aumenta a duração do ciclo estral em bovinos (HUGHES et al., 1987; MANN; LAMMING; FRAY, 1995; VILLA-GODOY et al., 1985), proporcionando ao conceito alguns dias a mais de crescimento antes da luteólise.

Em ovelhas, além da diminuição do E2 produzido pelo folículo da segunda onda de crescimento folicular, a P4 bloqueia a expressão gênica dos RNAm para os receptores de E2 e ocitocina (responsáveis pelo desencadeamento dos pulsos de  $PGF_{2\alpha}$ ) no endométrio uterino durante os primeiros 2/3 do ciclo estral (SPENCER et al., 2004), dessa forma o desencadeamento da luteólise poderia ser dificultado por uma maior bloqueio desses receptores em função de maiores concentrações plasmáticas de P4. Em bovinos, existem relatos de que ocorre bloqueio na expressão de receptores de E2 e P4 em diferentes momentos do diestro (BOOS et al., 1996). O mecanismo para esse fato ainda não está elucidado.

Segundo, o aumento da concentração plasmática de P4 no diestro estimula uma maior secreção de nutrientes pelo endométrio uterino (GEISERT et al., 1992). Com isso, um melhor desenvolvimento dos embriões poderia aumentar a produção de interferon- $\tau$  pelo concepto (KERBLER et al., 1997; MANN; LAMMING, 2001) e bloquear a luteólise de maneira mais eficiente (MANN; LAMMING; FRAY, 1995; MANN et al., 1999; WATHES et al., 1998), aumentando as taxas de concepção.

Dois fatos demonstrados no presente experimento podem estar relacionados com maiores concentrações plasmáticas de P4 no dia da inovulação. Primeiramente, os animais tratados com eCG no dia 5 apresentaram maior número médio de CL, achado também relatado por Nasser et al. (2004), e maior proporção de animais superovulados. Esse fato pode ser devido ao *status* folicular no momento de administração do eCG. O tratamento com 2 mg de BE e 50 mg de P4 administrado no momento da inserção do dispositivo intravaginal contendo P4 resulta na emergência de uma nova onda de crescimento folicular após 2 a 5 dias. Moreno et al. (2001) encontraram  $4,0 \pm 0,2$  dias em *Bos taurus*, e Sá Filho et al. (2004),  $3,6 \pm 0,7$  dias em novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* de intervalo entre o tratamento e a emergência da onda de crescimento folicular. Assim, quando o eCG foi administrado no dia 5, a onda apresentava-se no início, em estágio anterior à dominância folicular. Devido ao seu prolongado tempo de ação nos bovinos (MURPHY; MARTINUK, 1991), o tratamento com eCG no dia 5 estimulou o crescimento de mais de um folículo à ovulação, culminando em múltiplas ovulações. Por outro lado, quando o eCG foi administrado no dia 8, a dominância estava estabelecida e resultou na estimulação e na ovulação de apenas um folículo e, em poucos casos, também do maior folículo subordinado.

O segundo fato que pode ter contribuído para o aumento das concentrações plasmáticas de P4 pode estar relacionado aos animais que apresentaram CL único no dia da inovulação. O aumento da produção de P4 pelo CL único induzida após o tratamento com eCG pode ter levado ao incremento dos níveis plasmáticos de P4. O eCG se liga aos receptores de LH do CL (STEWART; ALLEN, 1981) melhorando a luteinização e aumentando a produção de P4. Experimentos anteriores (BARUSELLI et al., 2004; MARQUES et al., 2003) que compararam o uso ou não de eCG, verificaram que nos animais tratados houve aumento da P4 plasmática sem que houvesse aumento significativo do tamanho do CL único. Assim, o uso do eCG no dia 5 pode ter luteinizado mais eficientemente os CL únicos pelo maior tempo de exposição a essa gonadotrofina, apresentando maior produção de P4 pelo CL que as receptoras tratadas com eCG no dia 8.

Ainda, as receptoras que foram tratadas com eCG no dia 5 apresentaram menor proporção de animais com CL pequeno (classificação 18) e, conseqüentemente, maior porcentagem com CL grande (classificação 22). A estimulação prolongada pelo eCG a partir do dia 5 do protocolo pode ter induzido maior crescimento dos folículos ovulatórios, quando comparado aos dos animais tratados com eCG no dia 8. Devido a isso, pode-se supor que um maior diâmetro pré-ovulatório foi alcançado pelos folículos estimulados a partir do dia 5. Na literatura, o diâmetro do folículo ovulatório foi positivamente correlacionado com o diâmetro do CL formado, e este, com sua capacidade de produção de P4 (MANTOVANI et al., 2004a; VASCONCELOS et al., 2001). Santos et al. (2001) também encontraram correlação positiva e estatisticamente significativa entre a área do CL e a sua capacidade de produzir P4. Ainda, maior área do CL influenciou de maneira positiva as taxas de concepção em receptoras de embrião bovino

(BARUSELLI et al., 2000b; TRÍBULO et al., 2002) e em vacas de leite nos Estados Unidos (VASCONCELOS et al., 2001). No presente experimento, não se verificou efeito da dose de eCG empregada sobre a proporção de animais nos diferentes tamanhos de CL.

Baruselli et al. (2001) observaram aumento da área do CL único em receptoras tratadas com 800 UI de eCG no dia 5 do tratamento com CIDR<sup>®</sup> por 7,5 dias, comparadas às não tratadas ( $2,15 \pm 0,46$  vs.  $2,86 \pm 0,63$  cm<sup>2</sup>). Esse fato também foi relatado por Tribulo et al. (2002) que administraram 400 UI de eCG no dia 5 do tratamento com DIB<sup>®</sup> por 8 dias e observaram aumento do diâmetro do CL único ( $18,5 \pm 0,4$  vs.  $17,7 \pm 0,4$  mm), observando apenas 2 % de animais superovulados.

Nessa investigação não se observou efeito estatístico da dose de eCG administrada sobre a taxa de concepção. Mostrando que, assim como na taxa de aproveitamento, 400UI de eCG são suficientes para se alcançar taxas de concepção satisfatórias. No entanto, o aumento das doses de eCG levou a um aumento do número médio de CL, da porcentagem de animais superovulados e das concentrações plasmáticas de P4 no dia da inovulação.

Provavelmente, exista um limite para a taxa de concepção em relação à concentração plasmática de P4. A partir desse momento outros fatores passam a ser responsáveis por um possível aumento da concepção (ambientais, inerentes ao embrião, técnicos, etc.). Remsen e Roussel (1982) observaram aumento da taxa de concepção quando a concentração plasmática de P4 passou de 2 para 2 a 5 ng/ml (20 para 74%). No entanto, quando a P4 passou de 2 a 5 para acima de 5 ng/ml, a taxa de concepção manteve-se em 60%. Esse fato também foi observado por Reis et al. (2004) que verificaram aumento da taxa de concepção em receptoras *Bos*

*indicus* x *Bos taurus* de acordo com o aumento da P4 plasmática no dia da inovulação, com estabilização da concepção a partir de 4 ng/ml.

Nogueira et al. (2004) encontraram taxas de concepção aos 21 dias após a TE de 44,2% para os animais controle, 53,1% para os tratados com 200 UI de eCG, 25,0% para os tratados com 400 UI e 25,6% para os tratados com 600 UI. Os autores discutem que essa queda da taxa de concepção nos grupos 400 e 600 UI de eCG deve-se à ação de LH do eCG sobre os folículos maiores que 9 mm antes do pico de LH endógeno (maiores doses de eCG luteinizariam esses folículos) e à elevação prematura da P4 devido ao número elevado de ovulações por animal, o que levaria a uma descarga prematura de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . No entanto, os resultados do presente experimento indicam que mesmo o grupo com o maior número de CL (G-600d5 =  $2,4 \pm 0,2$ ) não apresentou redução da taxa de concepção. Baruselli et al. (2001) também verificaram que receptoras com elevado número de CL ( $2,6 \pm 2,9$ ) não apresentaram comprometimento da taxa de concepção.

A taxa de prenhez de um programa de TE caracteriza-se pelo produto entre a taxa de aproveitamento e a taxa de concepção. Desse forma, qualquer alteração nesses dois fatores afetar a taxa de prenhez na mesma proporção. Como descrito anteriormente, os resultados dessas duas variáveis foram afetados pelos tratamento, de forma que se refletiu na taxa de prenhez que foi estatisticamente superior nos animais tratados com eCG no dia 5 e semelhante entre as doses empregadas.

Um maior número de CL apresentou tendência de reduzir as perdas embrionárias/fetais entre 30 e 60 dias de gestação. O aumento das concentrações plasmáticas de P4 mostraram apenas uma redução numérica das perdas gestacionais de acordo com o aumento da P4, não sendo encontrada diferença estatística, possivelmente, pelo número de dados disponíveis para a realização

dessa análise. Como citado anteriormente, o CL é principal fonte de produção de P4 na fêmea bovina gestante e o embrião e o feto são dependentes dessa P4 do CL por, pelo menos, 200 dias de gestação (NISWENDER et al., 2000). Ainda, a associação direta encontrada por López-Gatius et al. (2002) entre a manutenção da gestação e o número de CL; e a redução das perdas gestacionais em animais tratados com fonte de P4 por 28 dias após o diagnóstico (LÓPEZ-GATIUS et al., 2004) mostram relação entre a progesterona e as perdas gestacionais.

O mecanismo para esse fato ainda não foi elucidado, no entanto, uma hipótese poderia ser proposta. Em ovelhas, do dia 15 ao 50 de gestação ocorre uma série de modificações morfológicas e ultra-estruturais no tecido uterino para a aderência do concepto e placentação. Ocorre o desenvolvimento dos placentomas nas áreas carunculares do endométrio uterino, remodelações do tecido vascular e crescimento substancial das glândulas endometriais intercarunculares (SPENCER et al., 2004). A partir desse momento as células epiteliais do endométrio uterino produtoras de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  são substituídas pelas ramificações das glândulas endometriais (GUILLOMOTT, 1995), eliminando a capacidade do endométrio produzir  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Transpondo esse raciocínio para bovinos, esse processo de transição da fase embrionária para fetal ocorre dos 28 aos 45 dias (NODEN; LAHUNTA, 1990; ROBERTS, 1986). Após a IA, o tecido fetal responsável pela secreção de interferon- $\tau$  mostrou-se produtivo até 43 dias em cultivo *in vitro* (STOJKOVIC et al., 1995) e até, no mínimo, 38 dias *in vivo* (GODKIN; LIFSEY; GILLESPIE, 1988). Pensando que o interferon- $\tau$  produzido nesse período embrionário tardio ainda estaria ativo no bloqueio da luteólise (células produtoras de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  presentes), um concepto de maior tamanho seria mais eficiente em bloquear

a luteólise que um de menor tamanho, como acontece entre os dias 16 e 23 após a IA (MANN; LAMMING; FRAY, 1995; MANN et al., 1999; WATHES et al., 1998).

Assim o aumento do número de CL e, conseqüentemente, de P4 plasmática levaria aos efeitos descritos anteriormente nessa dissertação sobre o crescimento embrionário, e um embrião de maior tamanho no período embrionário tardio seria menos suscetível à perda gestacional. Esse raciocínio pode ser reforçado pelo fato de Beal, Perry e Corah (1992) terem relatado que a maioria das perdas gestacionais em bovinos ocorrem durante o período embrionário (até o dia 42-45).

Sendo a manutenção de receptoras não gestantes um dos maiores custos em programas de TE, o eCG associado a dispositivo intravaginal de P4 torna-se uma ferramenta fundamental para obtenção de maior taxa de aproveitamento das receptoras em uma propriedade e, conseqüentemente, aumento da eficiência produtiva e da lucratividade. Este protocolo eleva a taxa de prenhez de 10 a 20% (em um programa com  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e detecção de estro ou com dispositivo intravaginal de P4 sem o uso de eCG) para 35 a 45%, eliminando ainda a necessidade de detecção do cio.

## 8 CONCLUSÃO

A hipótese de que, no protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal contendo progesterona para transferência de embriões em tempo fixo, a administração de eCG no dia 8 do tratamento apresenta resultados semelhantes à no dia 5 foi rejeitada. A segunda hipótese de que a administração de reduzidas doses de eCG são suficientes para se obter a mesma eficiência do protocolo foi aceita.

Dentro das finalidades propostas, é possível concluir que:

- A administração de eCG no dia 5 do protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo apresentou maior taxa de aproveitamento, de concepção, de prenhez, número de corpos lúteos e proporção de animais com CL único de maior tamanho que o protocolo com administração no dia 8;
- O uso de 400 UI de eCG foi adequado no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo;
- Maiores concentrações plasmáticas de P4 foram obtidas com o uso de eCG no dia 5. Receptoras tratadas com 600 UI de eCG apresentaram elevação da P4 plasmática;
- As perdas gestacionais entre 30 e 60 dias de gestação foram reduzidas em animais superovulados. Não se verificou redução das perdas embrionárias/fetais nos animais com maiores concentrações plasmáticas de progesterona.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 627-640, 1992.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; 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.

AHMAD, N.; TOWNSEND, E. C.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 1, p. 13-28, 1997.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 2369-2376, 1999.

BARNES, F. L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 649-658, 2000.

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. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15., 2000, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000b, p. 216.

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. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15., 2000, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000a, p. 217.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R.; BÓ, G. A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 355, 2001.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL

CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p. 117.

BEAL, W. E.; PERRY, R. C.; CORAH, L. R. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 3, p. 924-929, 1992.

BERGFELD, E. D.; KOJIMA, N.; WEHRMAN, M. F.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOCK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating  $17\beta$ -oestradiol concentrations in cows is related of concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 257-265, 1995.

BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 24, n. 3-4, p. 193-204, 1991.

BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided follicular ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 895-907, 1994.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.

BÓ, G. A. Sincronización de celos para programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE O CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000, 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, n. 1, p. 193-204, 1995b.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995a.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRÍBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol- $17\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

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.

BÓ, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, v. 36, n. 2, p. 169-183, 1991.

BÓ, G. A.; TRÍBULO, H.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 357, 2001.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 6, p. 1115-1128, 1996.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 5-17, 1991.

BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, R.; GRUNERT, E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, n. 1, p. 11-21, 1996.

BURATINI JR., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3-4, p. 161-174, 2001.

CARTMILL, J. A.; EL-ZARKOUNAY, S. Z.; HENSLEY, B. A.; ROZELL, T. G.; SMITH, J. F. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 799-806, 2001.

CARVALHO, J. B. P.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Follicular wave and luteal function in *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers treated with progesterone device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p. 112.

**CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL.** Disponível em: <<http://www.cna.org.br>> Acesso em: 23 de ago. 2004.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; WHITTAKER, P. R.; GAVAGA, Q. A.; WILDE, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1-2, p. 25-34, 2004.

COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 4, p. 670-691, 1992.

CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; ALISIO, L.; TEGLI, J. C.; MORENO, D.; BÓ, G. A. Efecto de los tratamientos con dispositivos DIV-B nuevos o reutilizados en los índices de preñez en vacas y vaquillonas inseminadas a tiempo fijo (IATF). In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., Córdoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 2001, p. 244.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; FERRAZ, M. L.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, Y. F. Influence of the embryo stage, development kinetics and recipient synchronization on pregnancy rates of OPU-IVP embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 492, 2002.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 211-228, 2002.

D'OCCHIO, M. J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion post-partum between zebu and European breed cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 22, n. 4, p. 311-317, 1990.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 39-44, 2000.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v. 9, n. 1, p. 17-26, 1978.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FIKE, K. E.; KOJIMA, F. N.; LINDSEY, B. R.; BERGFELD, E. G. M.; QUINTAL-FRANCO, J. A.; MELVIN, E. J.; ZANELLA, E. L.; WEHRMAN, M. E.; KINDER, J. E. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change

in circulation concentration of female cattle. **Animal Reproduction Science**, 2004 (No prelo).

FUENTES, S.; DE LA FUENTE, J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipients heifers. In: ANNUAL MEETING AETE, 13., 1997, Lyon. **Proceedings...** Lyon: France Form, 1997, p. 148.

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, n. 3, 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, n. 1, p. 11-25, 1988.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 1, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 8, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 75-87, 1997.

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. 2, p. 1187-1194, 1996.

GODKIN, J. D.; LIFSEY, B. J.; GILLESPIE, B. E. Characterization of bovine conceptus proteins produced during the peri- and post-attachment periods of early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 703-711, 1988.

GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 3, p. 133-139, 2002.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Superovulation in heifers using either pregnant mare's serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 36, n. 6, p. 949-958, 1991.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 39-51, 1995.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N. B.; WICHTEL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L.; PFEIFFER, D. U. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 775-785, 1996.

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. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1401-1415, 2001.

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.

HOMMEIDA, A.; NAKAO, T.; KUBOTA, H. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 217-225, 2004.

HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J. S.; FOGWELL, R. L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -induced luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 3, p. 523-529, 1987.

JONKER, F. H. Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 415-430, 2004.

KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1-2, p. 13-24, 1991.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, n. 3, 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, n. 3, p. 703-714, 1997.

KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-waves hypothesis by ultrasonically

monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 111-119, 1989.

KO, J. C. H.; KASTELIC, J. P.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J.; Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, n. 2, 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. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and  $17\beta$ -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 an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1287-1299, 1997.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 913-921, 1999.

KURAN, M.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 1-2, p. 1-12, 1996.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255-267, 1992.

LAVERDIERE, G.; ROY, G. L.; PROULX, J.; LAVOIE, D.; DUFOUR, J. J. Estrus synchronization efficiency of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  injection in Shorthorn-Hereford and crossbred Charolais cattle not having exhibited estrus at 4 or 7 days prior to treatment. **Theriogenology**, v. 43, n. 5, p. 899-911, 1995.

LOPES DA COSTA, L.; CHAGAS E SILVA, J.; ROBALO SILVA, J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 65-77, 2001.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; HUNTER, R. H. F. Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, n. 8, p. 1529-1535, 2004.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; RUTLLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1251-1261, 2002.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, R. L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

- LUNN, P.; VAGNANI, K. E.; GINTHER, O. J. The equine immune response to endometrial cups. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 34, n. 3, p. 203-216, 1996.
- MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 307-320, 1996.
- MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentration in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1-2, p. 25-40, 1991.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cow. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.
- 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, n. 2, p. 121-131, 1995.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C. The regulation of interferon- $\tau$  production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 317-328, 1999.
- MANTOVANI, A. P.; REIS, E. L.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; GACEK, F. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR<sup>®</sup>) on the induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004a, p. 133.
- MANTOVANI, A. P.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Efeito da concentração plasmática de progesterona na dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004b, p. 232.
- 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. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15., 2003, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 24-51.
- MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 2003, p. 392.



MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 23-33, 1999.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, 2000.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; JANSEN, E.; OLSON, W.; MAPLETOFT, R. J. Alternative methods of synchronizing estrus and ovulation for fixed-time insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 4, n. 1, p. 350, 1998.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. The use of estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 363-372, 2004.

MCCRACKEN, J. A. Prostaglandins and luteal regression – a review. **Prostaglandins**, v. 1, n. 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, n. 1-2, p. 133-154, 1995.

MCDOWELL, K. J.; ADAMS, M. H.; BAKER, C. B. Chorionic gonadotropin  $\alpha$  and  $\beta$  subunit RNA's are present in equine placental membrane by day 30 of pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 3-4, p. 515-518, 1993.

MELLO, M. R. B. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo**. 2003. 82 f. Tese (Doutorado em reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. • **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, 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, n. 4, p. 191-200, 2002.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore  $\times$  Angus (*Bos taurus indicus*  $\times$  *Bos taurus taurus*)**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; CACCIA, M.; TRÍBULO, H.; CHESTA, P.; VILLATA, M. L.; BÓ, G. A. Fixed-Time embryo transfer in cows treated with progesterone vaginal devices and induced to ovulate with estradiol benzoate or hCG. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 307, 2003.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; CACCIA, M.; GATTI, G.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; BÓ, G. A. Effect of the time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 552, 2002.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicular wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 408, 2001.

MORENO, I. Y. D.; GALINA, C. S.; ESCOBAR, F. J.; RAMÍREZ, B.; NAVARRO-FIERRO, R. Evaluation of the lytic response of prostaglandin F2 alpha in Zebu cattle based on serum progesterone. **Theriogenology**, v. 25, n. 3, p. 413-421, 1986.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, M. A.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Comparison of four synchronization protocols for fixed time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v. 62, n. 9, p. 1577-1584, 2004.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroids hormone on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 33-42, 2002.

NIEMANN, H.; SACHER, B.; ELSAESER, F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 23, n. 4, p. 631-639, 1985.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of development ally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21-34, 2000.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domesticos**. Zaragoza: Acríbia, 1990, p. 59.

NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M.; FUCK, E. J.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryos recipients synchronized with PGF2 $\alpha$  and eCG? **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1283-1290, 2004.

NORTHEY, D. L.; FRENCH, L. R. Effect of embryo removal and intra-uterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 2, p. 298-302, 1980.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 817-830, 1990.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F<sub>2α</sub> synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 255-264, 2002.

PARFET, J. R.; SMITH, C. A.; COOK, D. L.; SKYER, D. M.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Secretory patterns of LH and FSH and follicular growth following administration of PGF<sub>2α</sub> during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 31, n. 3, p. 513-524, 1989.

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.

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

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; DO VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F<sub>2α</sub> or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 667-81, 1998.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 1-2, p. 300, 1976.

RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 170-185, 1984.

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, n. 3, p. 277-320, 2001.

REFSAL, R. K.; SEGUIN, B. E. Effect of stage of diestrus and number of cloprostenol (ICI 80,996) injections on interval to estrus, LH peak and ovulation in heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 37-48, 1980.

REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; NASSER, L. F.; COSTA NETO, W. P.; BARUSELLI, P. S. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da inovação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p. 88.

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, n. 1, p. 39-47, 1996.

RHODES, J. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995.

RIVERA, H.; LOPEZ, H.; FRICKE, P. M. Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI or AI after removed tail chalk. **Journal of Dairy Science**, 2004. (No prelo)

ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOK, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 6, p. 997-1003, 1989.

ROBERTS, S.J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (theriogenology)**. 3. ed. Michigan: Edwards Brothers, 1986, p. 39.

ROCHE, J. F. Calving rate of cows following insemination after 12-day treatment with silastic coils impregnated with progesterone. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 164-169, 1976.

SÁ FILHO, M. F.; AMARAL, J. P. B.; MANTOVANI, A. P.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Effect of synthetic progesterone (Afisterone<sup>®</sup>) administration at the moment of CIDR<sup>®</sup> insertion on follicular wave emergence in beef heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p. 127.

SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; BERGFELD, E. D.; 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 $\beta$ -estradiol in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 464-469, 1995.

SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 513-535, 2004.

SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; POOL, L.; OVERTON, M. W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 11, p. 2881-2894, 2001.

- SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Caracterização morfológica do início do desvio (divergência) folicular, em novilhas e vacas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17., 2003, Beberibe. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 558-559.
- SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 35-50.
- SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.
- SARTORI, R.; GUMEN, A.; GUENTER, J. N.; SOUZA, A. H.; WILTBANK, M. C. Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 238-239, 2003.
- SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Patter of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.
- SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.
- SILVIA, W. J. The role of uterine and ovarian hormones in luteolysis: a comparison among species. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 34, n. 4, p. 317-328, 1999.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308-317, 1988.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 287-297, 2001.
- SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 2-10, 2004.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. SAS user's guide: statistics. Cary: SAS, 2000, Versão 8.0.
- STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, n. 2, p. 527-536, 1981.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.

STOJKOVIC, M.; WOLF, E.; BUTTNER, M.; BERG, U.; CHARPIGNY, G.; SCHIMITT, A.; BREM, G. Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1500-1507, 1995.

TANABE, T. Y.; HANN, R. C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin F<sub>2α</sub>. I. Influence of stage of cycle at treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 4, p. 805-811, 1984.

THATCHER, W. W.; DROST, M.; SAVIO, K. L.; MACMILLAN, K. L.; SCHMITT, E. J.; ENTWISTLE, K. W.; DE LA SOTA, R. L.; MORRIS, G. R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 27-49, 1993.

THIBIER, M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report from the IETS data retrieval committee. **IETS Newsletter**, 2003.

THIBIER, M. The animal embryo transfer industry in figures: a report from the IETS data retrieval committee. **IETS Newsletter**, 2001.

TOWNSON, D. H.; TSANG, P. C.; BUTLER, W. R.; FRAJBLAT, M.; GRIEL Jr, L. C.; JOHNSON, C. J.; MILVAE, R. A.; NIKSIC, G. M.; PATEL, J. L. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1053-1058, 2002.

TRÍBULO, H.; BÓ, G. A.; GATTI, G.; TEGLI, J. C.; CUTAIA, L.; MORENO, D.; 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, 2., 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm: Repro Print AB, 2000, p. 115.

TRÍBULO, H.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; GATTI, G.; TRÍBULO, R.; CACCIA, M.; BÓ, G. A. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 563, 2002.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase a precision of estrus in cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3141-3151, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

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, n. 2, p. 519-527, 1985.

WATHES, D. C.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 4, p. 279-284, 1998.

WILTBANK, J. N.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combination with gonadotrophins on the estrous cycle of beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 341-346, 1961.

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

WILTBANK, M. C. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 83-97, 1997.

ZANENGA, C. A.; PEDROSO, M. F. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 10., 1995, São Paulo. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1995, p. 151.

ZANENGA, C. A.; PEDROSO, M. S.; LIMA, G. S.; SANTOS, I. C. C.; Transferência de embriões em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15., 2000, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000, p. 349.

ZEITOUN, M. M.; RODRIGUEZ, H. F.; RANDEL, R. D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 45, n. 8, p. 1577-1581, 1996.