

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG) EM NOVILHAS DE CORTE SUBMETIDAS A
PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

MARCOS ROSA DE ALMEIDA

PORTO ALEGRE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG) EM NOVILHAS DE CORTE SUBMETIDAS A
PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO.**

Autor: Marcos Rosa de Almeida

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução Animal.

Orientador: Dr. João Batista Souza Borges

PORTO ALEGRE
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Rosa de Almeida, Marcos
EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL OU GONADOTROFINA
CORIÔNICA HUMANA (hCG) EM NOVILHAS DE CORTE
SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO DA
OVULAÇÃO / Marcos Rosa de Almeida. -- 2016.
78 f.

Orientador: João Batista Souza Borges.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. ressinchronização da ovulação. 2. benzoato de
estradiol. 3. hCG. 4. corpo lúteo. 5. taxa de
prenhez. I. Souza Borges, João Batista, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARCOS ROSA DE ALMEIDA

Efeito do benzoato de estradiol ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) em novilhas de corte submetidas a protocolos de ressincronização da ovulação.

Aprovada em 21 MAR 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Batista Souza Borges

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Paulo Ricardo Loss Aguiar

Membro da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Santos Gottschall

Membro da Comissão

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que de alguma forma participaram desta importante etapa da minha vida acadêmica e profissional. Nada se constrói sozinho, portanto dedico a vocês o êxito desta etapa.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. João Batista Souza Borges** pelo apoio, orientação, críticas e ensinamentos constantes; **respeito e gratidão serão permanentes** pela oportunidade concedida.

Aos Professores **Marcelo Bertolini, Paulo Ricardo Loss Aguiar e Carlos Santos Gottschall**, pela importante colaboração para o desfecho deste trabalho.

Em especial ao Professor **Gottschall** pela consideração, confiança e incentivos desde a graduação.

Aos colegas da Unidade de Reprodução de Bovinos da UFRGS pela parceria na execução do experimento, **Eduardo Pradebon da Silva, Amanda Bilha, Laís Steffen Gambin e Letícia Baumbach**.

Aos proprietários e funcionários de todas as propriedades onde os experimentos foram realizados, em especial aos colegas e parceiros: **Marcelo Maronna Dias e Fabrício de Azevedo Velho** – Fazendas Porteira Velha e Vitória; **Jean Soares e Reinaldo Leopoldino de Souza** – Fazenda Pantano; **Renato José Martini Filho** – Fazenda Santa Rita; **Peti Wairich** – JMT Agropecuária; **Lorenzo de Reuter Sperandio** – Sperandio Agropecuária. Obrigado a todos pela disposição em ceder os locais de trabalho para execução dos experimentos.

A empresa **Hertape Saúde Animal** em especial a **Humberto Luis Neri e Daniele Tonon Schreiner** por fornecerem os tratamentos hormonais utilizados neste trabalho.

Ao amigo e parceiro de trabalho **Leonardo Canali Canellas**, referência profissional e acadêmica. Gracias pela parceria e transparência em todos os momentos.

Aos meus pais, **Luiz Carlos e Suzana**, pelo companheirismo e amor inabaláveis frente a qualquer desafio. Agradeço pela incondicional compreensão e apoio durante minha formação profissional.

À **Gabriela** pela essência, companheirismo, amor e, principalmente, pela compreensão as minhas ausências durante a execução deste trabalho.

Epígrafe

**“Os dias prósperos não vêm por acaso,
Nascem de muita fadiga e persistência.”**

(Henry Ford)

Efeito do benzoato de estradiol ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) em novilhas de corte submetidas a protocolos de ressincronização da ovulação.

Resumo

*O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ressincronização da ovulação, iniciada 24 dias após a primeira IATF, sobre a área do corpo lúteo (CL), a concentração plasmática de progesterona (P4) e a taxa de prenhez. **Exp.1** 526 novilhas Brangus com idades entre 24 e 26 meses, foram submetidas a um programa de IATF no início da estação de acasalamento. O protocolo de sincronização para a primeira IATF começou com a inserção de um implante intra-vaginal contendo 750 mg de P4 e a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (i.m.) no dia -9 (D-9). Depois de sete dias (D-2), os implantes de P4 foram removidos, e 150 µg de D-cloprostenol (PGF), i.m., e 1 mg de cipionato de estradiol (CE), i.m., foram administrados. A IATF foi realizada entre 48 e 54 horas após a remoção do implante de P4 (D0). Vinte e quatro dias após a primeira IATF (D24), as novilhas foram divididas aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: controle (n = 167, sem tratamento), BE (n = 208, 1 mg de BE, i.m.) e hCG (n = 151, 1000 UI de hCG, i.m.). Novilhas dos grupos BE e hCG receberam um novo implante intra-vaginal contendo 750 mg de P4 na D24. No dia 31 (D31), os implantes de P4 foram removidos e o diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia. As taxas de prenhez da primeira IATF no D31 foram 58,7% (98/167), 53,4% (111/208) e 52,9% (80/151), respectivamente, para os grupos controle, BE e hCG. Novilhas diagnosticadas como não gestantes receberam 150 µg de PGF, i.m., e 1 mg de CE, i.m., sendo a segunda IATF realizada 48 a 54 horas após a remoção do implante (D33). No D31, os subgrupos de novilhas prenhes de cada grupo experimental foram aleatoriamente divididos, sendo realizado exame por ultrassonografia para determinar a área do CL e coleta de uma amostra de sangue para determinar a concentração sérica de P4: Controle (n = 13), BE (n = 26), e hCG (n = 24). A área de CL foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo hCG ($3,42 \pm 0,76 \text{ cm}^2$), em comparação aos grupos de BE ($2,44 \pm 0,57 \text{ cm}^2$) e controle ($2,61 \pm 0,61 \text{ cm}^2$). Da mesma forma, a concentração sérica de P4 foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo hCG ($12,43 \pm 3,48 \text{ ng/ml}$) em comparação aos grupos BE ($6,92 \pm 3,04 \text{ ng/ml}$) e controle*

(7,29±2,45 ng/ml). O uso do BE e do hCG em programas de ressincronização da ovulação 24 dias após a IATF não interferiu na taxa de prenhez da primeira IATF. É provável que o mecanismo de ação do BE não afete a atividade do CL, a produção de P4, e conseqüentemente, não tenha efeito negativo na manutenção da prenhez em protocolos de ressincronização da ovulação. O tratamento com hCG resultou no aumento da área de CL e da produção de P4, porém, este efeito não favoreceu a taxa de prenhez da primeira IATF. **Exp.2** 184 novilhas Brangus com idade entre 24 a 26 meses e peso corporal médio de 361±29,2 kg foram submetidas a dois programas de IATF. O protocolo de sincronização para a primeira IATF foi o mesmo utilizado no **Exp.1**. Vinte e quatro dias após a primeira IATF (D24), as novilhas foram aleatoriamente divididas conforme os hormônios utilizados para ressincronização, formando os seguintes grupos experimentais: BE (n = 83, 1 mg de BE, i.m.) e hCG (n = 101, 1000 UI de hCG, i.m.). Novilhas dos grupos BE e hCG receberam um novo dispositivo intravaginal contendo 750mg de progesterona no D24. No D31, os implantes foram removidos e o diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado. As taxas de prenhez da primeira IATF no D31 foram de 63,9% (53/83) e 64,9% (65/101), respectivamente, para os grupos BE e hCG. Novilhas diagnosticadas como não gestantes (n=66) receberam 150 µg de PGF, i.m., e 1 mg de CE, im; a segunda IATF foi realizada no D33. Trinta dias após a segunda IATF (D63), foi realizado o segundo diagnóstico de gestação. As perdas gestacionais entre o D31 e D63, das novilhas prenhes da primeira IATF foram 9,4% (5/53) e 6,2% (4/65) respectivamente para os grupos BE e hCG. As taxas de prenhez da segunda IATF foram 40,0% (12/30) e 22,2% (8/36), respectivamente, para os grupos BE e hCG. As taxas de prenhez acumulada para os grupos BE e hCG foram, respectivamente, 72,3% (60/83) e 68,3% (69/101). O uso do BE e hCG para ressincronização da ovulação 24 dias após a primeira inseminação não afetou a taxa de prenhez da primeira IATF. As taxas de prenhez obtidas na segunda IATF foram inferiores às expectativas, considerando a resposta da primeira IATF. Entretanto, as taxas de prenhez acumulada foram similares e satisfatórias para os primeiros 33 dias da estação de acasalamento.

Palavras-chave: ressincronização da ovulação, benzoato de estradiol, hCG, corpo lúteo e taxa de prenhez

*Effect of estradiol benzoate or human chorionic gonadotropin (hCG) in beef heifers
submitted at resynchronization of ovulation protocols.*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of resynchronization of ovulation, which began 24 days after the first TAI, on the corpus luteum area (CL), plasma progesterone production (P4) and pregnancy rates. **Exp.1** 526 Brangus heifers between 24 and 26 months of age were submitted to a TAI program at the beginning of the breeding season. The protocol synchronization for the first TAI started with the insertion of an intravaginal implant containing 750 mg progesterone (P4) and the administration of 2 mg of estradiol benzoate (EB) intramuscular (i.m.) on day -9 (D-9). After seven days (D-2), P4 implants were removed, and 150 µg D-cloprostenol (PGF), and 1 mg estradiol cypionate (EC), were administered, i.m. The TAI was carried out between 48 and 54 hours after removal of the P4 implant (D0). Twenty-four days after the first TAI (D24), heifers were divided randomly into the following groups: control (n = 167, untreated), EB (n = 208, 1 mg EB, i.m.) and hCG (n = 151, 1000 IU hCG, i.m.). Heifers of the EB and hCG groups received a new intravaginal implant containing 750 mg of P4 on D24. On day 31 (D31), P4 implants were removed and the pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography. Pregnancy rates for the first TAI, on D31, were 58.7% (98/167), 53.4% (111/208) and 52.9% (80/151), respectively, for the control, EB and hCG groups. Non-pregnant heifers received 150 µg PGF, i.m., and 1 mg EC, i.m., and the second TAI was performed 48 to 54 hours after removal of the P4 implant (D33). On D31, subgroups of pregnant cows from each experimental groups were randomly divided to determine the surface area of the CL by ultrasound and blood samples were collected to determine P4 concentrations: control (n = 13), BE (n = 26), and hCG (n = 24). The surface area of the CL was significantly higher ($P < 0.05$) in the hCG group ($3.42 \pm 0.76 \text{ cm}^2$) compared to the EB ($2.44 \pm 0.57 \text{ cm}^2$) and control ($2.61 \pm 0.61 \text{ cm}^2$) groups. Also, P4 concentrations were significantly higher ($P < 0.05$) in the hCG group ($12.43 \pm 3.48 \text{ ng/mL}$) compared to the EB groups ($6.92 \pm 3.04 \text{ ng/mL}$) and control ($7.29 \pm 2.45 \text{ ng/mL}$). The use of EB and hCG in ovulation resynchronization programs 24 days after TAI did not affect the pregnancy rates of the first TAI. It is likely that EB

mechanism of action does not affect the activity of the CL and P4 production, consequently having no negative effect on the maintenance of pregnancy. Nevertheless, the hCG treatment on D24 increased the area of CL and P4 plasma levels, but this effect neither improves nor compromised pregnancy rate of the first TAI. **Exp.2** 184 aged 24-26 months Brangus heifers old with mean body weight of 361 ± 29.2 kg were submitted to two consecutive TAI programs. The synchronization protocol to the first TAI was the same as in Exp.1. Twenty-four days after the first TAI (D24), heifers were randomly divided according to the hormones used for resynchronization, according to the following groups: BE (n = 83, 1 mg EB, i.m.) and hCG (n = 101, hCG 1000 IU, i.m.). Heifers of the EB and hCG groups received a new intravaginal device containing 750 mg of progesterone on D24. On D31, P4 implants were removed and pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography. The first TAI pregnancy rates on D31 were 63.9% (53/83) and 64.9% (65/101), respectively, for the EB and hCG groups. Heifers diagnosed as open received 150 μ g PGF, i.m., and 1 mg EC, i.m.; the second TAI was performed on D33. Thirty days after the second TAI (D63), the second pregnancy diagnosis was performed. Pregnancy loss rates from D31 to D63 were 9.4% (5/53) and 6.2% (4/65) respectively for the EB and hCG groups. Pregnancy rates for the second TAI were 40.0% (12/30) and 22.2% (8/36), for the EB and hCG groups respectively. The cumulative pregnancy rates for EB and hCG groups were, respectively, 72.3% (60/83) and 68.3% (69/101). The use of hCG and EB for resynchronization of ovulation 24 days after the first insemination did not affect pregnancy rates of the first TAI. Pregnancy rates obtained in the second TAI were below expected values, considering the first TAI response. However, cumulative pregnancy rates were similar and satisfactory for the first 33 days of the breeding season.

Keywords: resynchronization ovulation, estradiol benzoate, hCG, the corpus luteum and pregnancy rate

Lista de Abreviaturas e Siglas

BE - Benzoato de estradiol
BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas
CE - Cipionato de estradiol
CL - Corpo lúteo
cm² - Centímetros quadrados
E2 - Estradiol - 17β
ECC - Escore de condição corporal
EGF – Fator de crescimento epidérmico
ER - Receptores para estradiol
FGFb - Fator de crescimento básico de fibroblastos
FSH - Hormônio folículo estimulante
FSH-R - Receptor para o hormônio folículo estimulante
g - Grama
GH - Hormônio do crescimento
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG - Gonadotrofina coriônica humana
HDL - Lipoproteína de alta densidade
i.m. - Intramuscular
IA - Inseminação artificial
IATF - Inseminação artificial em tempo fixo
IFN-τ – Interferon-tau
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IGF-II - Fator de crescimento semelhante à insulina - 2
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LH - Hormônio luteinizante
LH-R - Receptor para o hormônio luteinizante
mg - Miligrama
MHz - Mega-hertz
mL - Mililitro
mm - milímetro
n - Número
ng - Nanogramas
OCT - Ocitocina
OTR - Receptor para ocitocina
P4 - Progesterona
PGF - Prostaglandina F2 alfa
PGF2α - Prostaglandina F2 alfa
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro
TGFβ - Fatores de transformação de crescimento
UI - Unidade internacional
US - ultrassonografia
α - Alfa
β - Beta
μg - Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo geral.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	BASES FISIOLÓGICAS DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS.....	17
2.1.1	Foliculogênese.....	17
2.1.2	Ciclo estral e dinâmica folicular.....	18
2.2	ASPECTOS DO RECONHECIMENTO E MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO...22	
2.2.1	Reconhecimento materno da gestação	22
2.2.2	Mecanismos de ação do IFN- τ	23
2.2.3	Formação do corpo lúteo e a relação com a luteólise.....	25
2.2.4	Placentação e implantação embrionária	26
2.3	INFLUÊNCIA HORMONAL SOBRE A MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO.....26	
2.3.1	Importância do corpo lúteo e da progesterona na manutenção da gestação.....	27
2.3.2	Influência do estradiol sobre o ambiente uterino	28
2.3.3	Influência da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as estruturas ovarianas e a produção de progesterona.....	30
2.4	RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO.....	31
3	ARTIGO 1 - Efeito da aplicação de benzoato de estradiol ou da gonadotrofina coriônica humana em protocolos de ressinchronização da ovulação sobre a prenhez da IATF	36
4	ARTIGO 2 - Desempenho reprodutivo de novilhas acasaladas entre 24 a 26 meses de idade submetidas a dois programas de IATF em 33 dias.....	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é constituído de aproximadamente 212 milhões de cabeças (IBGE, 2014). Deste total, em torno de 76,1 milhões de animais compõem-se de fêmeas entre 2 a 3 anos de idade (13,5 milhões de cabeças) e vacas adultas (62,6 milhões de cabeças). Estes fatos relacionados ao avanço da agricultura sobre as áreas anteriormente exploradas exclusivamente pela pecuária refletem na necessidade de ampliar o uso de tecnologias nas diversas etapas produtivas de bovinos de corte, principalmente em rebanhos de cria. O uso de biotecnologias como a inseminação artificial, tem proporcionado o aumento de ganhos genéticos na produção de terneiros e a otimização do manejo em rebanhos de cria com o maior controle das estações de acasalamento e parição (STEVENSON et al., 2003). A partir dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) busca-se aumentar o número de fêmeas bovinas parindo terneiros produzidos pela inseminação artificial, aumentando a taxa de serviço e reduzindo o intervalo entre as inseminações sem o comprometimento da sobrevivência do concepto (CAMPOS et al., 2013). Atualmente relata-se que a IATF pode proporcionar taxas de prenhez de 40 a 60% na primeira IA, sem detecção de estro e no início da estação de acasalamento (PENTEADO et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006). Neste sentido, a repetição dos protocolos de IATF pode proporcionar altas taxas de prenhez em um curto espaço de tempo durante a estação reprodutiva, resultando em aumento da taxa de serviço e reduzido intervalo entre as IA's (CAMPOS et al., 2013).

Estudos prévios têm demonstrado que a ressincronização do retorno estral permite repetir a inseminação de fêmeas não gestantes na primeira inseminação artificial (GALVÃO et al., 2007; BUTTREY et al., 2010). Entretanto, para evitar a necessidade de observação do estro para executar o segundo serviço, tem sido proposto iniciar os programas de ressincronização da ovulação para a segunda inseminação antes do primeiro diagnóstico de gestação. De maneira geral, os protocolos utilizados para ressincronização do estro são os mesmos utilizados para sincronizar a ovulação para a primeira IATF, porém, iniciam 7 a 8 dias antes do primeiro diagnóstico de gestação precoce realizado 28 a 31 dias após a primeira IATF. Assim, a aplicação da

prostaglandina é realizada logo após a determinação dos animais prenhes, sem risco de induzir a luteólise indesejada e a perda reprodutiva.

Grande parte dos estudos sobre ressincronização de fêmeas bovinas, com prenhez ainda desconhecida, foram realizados com a administração de GnRH para a indução da nova onda de emergência folicular, sendo limitados os estudos sobre a viabilidade de uso do benzoato de estradiol nestes protocolos (CAMPOS et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2014). Estudos relatam que a aplicação de estradiol durante o meio do ciclo estral para ressincronização do retorno estral pode comprometer a capacidade do corpo lúteo em produzir progesterona (MUNRO e MOORE, 1985; EL-ZARKOUNY e STEVENSON, 2004) e implicar na diminuição da taxa de prenhez da primeira inseminação (CUTAIA et al., 2002). Entretanto, estes autores não apresentaram avaliações da utilização deste hormônio sobre a manutenção da gestação pré-estabelecida. Estudou-se como alternativa a aplicação da gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor da nova onda folicular no início dos programas de ressincronização (BUTTREY et al., 2010). Os autores relataram que o hCG poderia induzir um maior número de folículos à ovulação no início do protocolo de ressincronização e, por consequência, aumentar a sincronização da ovulação e a taxa de prenhez após a segunda inseminação. Além do mais, BUTTREY et al. (2010), consideram que o maior número de corpos lúteos auxiliares resultantes da aplicação do hCG pode aumentar a concentração de progesterona nas fêmeas prenhes e reduzir as perdas gestacionais que podem ocorrer devido a manipulação hormonal do protocolo de ressincronização.

Frente a estas considerações, a utilização de hormônios que tenham a capacidade de induzir uma nova onda folicular e que não tenham efeitos deletérios sobre a manutenção da gestação pode ser um aspecto determinante para o sucesso da ressincronização (SÁ FILHO et al., 2014; BUTTREY et al., 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas de corte submetidas a diferentes protocolos de ressincronização da ovulação prévios ao diagnóstico de gestação da primeira inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a aplicação de protocolos de ressincronização da ovulação com progesterona, benzoato de estradiol ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre a área do corpo lúteo e a concentração sérica de progesterona de novilhas prenhes da primeira IATF;

- Avaliar as taxas de prenhez da primeira IATF e a acumulada após a segunda IATF de novilhas de corte submetidas a diferentes tratamentos hormonais para ressincronização da ovulação;

- Determinar as perdas gestacionais entre 31 e 63 dias da primeira IATF em novilhas submetidas aos tratamentos com BE ou hCG e progesterona para a realização da segunda IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BASES FISIOLÓGICAS DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS

O conhecimento dos conceitos básicos da reprodução é fundamental para o entendimento da aplicação das tecnologias estudadas. A espécie bovina possui características relacionadas à foliculogênese e, principalmente a dinâmica folicular, que implicam na resposta reprodutiva após a aplicação de protocolos de sincronização de estro e ovulação. Considerações sobre a foliculogênese, ciclo estral e dinâmica folicular serão descritas a seguir para maior compreensão dos trabalhos realizados.

2.1.1 Foliculogênese

O ovário é a estrutura anatômica das fêmeas responsável pela gametogênese de oócitos fecundáveis e pela esteroidogênese de hormônios, necessários para a concepção e manutenção da prenhez (HAFEZ e HAFEZ, 2000). Entre 40 a 70 dias pós-concepção a região cortical e medular do ovário estão presentes em fetos bovinos, ocorrendo o processo de formação de oócitos a partir da meiose das oogônias até aproximadamente 150 dias de idade fetal (ERICKSON, 1996). Nesta etapa os oócitos passam a ser rodeados por células da granulosa achatadas, consideradas então células da pré-granulosa, e circundados por uma lâmina basal formando assim os folículos primordiais.

O processo de ativação e desenvolvimento dos folículos primordiais à folículos primários ocorre de forma independente da ação de gonadotrofinas, sendo esta fase denominada de recrutamento folicular (ROCHE, 1996). Durante o recrutamento folicular ocorre o início da proliferação e diferenciação das células da granulosa, adquirindo conformação cubóide, seguido da formação da zona pelúcida que é composta de substâncias glicoprotéicas. Neste estágio o folículo já é responsivo à gonadotrofina FSH, prosseguindo o seu crescimento (HAFEZ e HAFEZ, 2000). O folículo secundário constitui-se da formação das primeiras células da teca e a composição de mais duas a três camadas de células da granulosa.

A formação do folículo terciário acontece pela ação das gonadotrofinas, principalmente do FSH, caracterizando-se pela proliferação do líquido folicular entre as células da granulosa formando o primórdio da cavidade antral (HAFEZ e HAFEZ,

2000). Os folículos antrais são constituídos de um oócito circundado intimamente pela zona pelúcida, corona radiata e pelo “cumulus oophorum” formado por células da granulosa que se pronunciam até a estrutura oocitária, havendo também camadas de células tecais (SANTOS et al., 2008). Neste estágio ocorrem os processos de divergência e dominância folicular e por consequência a atresia ou a ovulação. O período representado pelo crescimento e diferenciação de um folículo primordial em um folículo ovulatório tem duração aproximada de 60 dias (LUSSIER et al., 1987).

2.1.2 Ciclo estral e dinâmica folicular

Os bovinos são animais poliéstricos anuais, que apresentam comportamento estral entre 17 a 25 dias, compreendendo um intervalo médio de 21 dias (SIROIS e FORTUNE, 1988). O ciclo estral é definido como o período decorrido entre dois episódios de manifestação do comportamento estral em fêmeas cíclicas e não gestantes, sendo controlado por interações de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise anterior, ovários e útero (HAFEZ e HAFEZ, 2004). De maneira geral o ciclo estral é dividido em quatro fases: pró-estro, estro, metaestro e diestro. Estas fases podem ser agrupadas em duas grandes fases que relacionam a ação hormonal que ocorrem nas mesmas, ou seja, fase folicular ou estrogênica que compreende do crescimento folicular até a ovulação (pró-estro e estro), e a fase luteínica ou progesterônica que compreende da formação do corpo lúteo até a luteólise (metaestro e diestro) (MACMILLAN e BURKE, 1996).

A teoria das ondas foliculares foi inicialmente proposta por RAJAKOSKI (1960). O autor realizou estudos histológicos em ovários de novilhas e sugeriu a ocorrência de duas ondas de desenvolvimento de folículos antrais durante o ciclo estral. Posteriormente foi demonstrada, por exames ultrassonográficos, a ocorrência de duas até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo (PIERSON e GINTHER, 1988). A dinâmica folicular e suas inter-relações com os intervalos de tempo, alterações endocrinológicas e ovarianas durante o ciclo foram amplamente estudadas a partir destes estudos prévios (GINTHER et al., 1989a; ADAMS et al., 1992).

A dinâmica folicular pode ser definida como o processo contínuo de crescimento e regressão de folículos que culmina com o desenvolvimento do folículo ovulatório

(LUCY et al., 1992). Segundo Webb et al. (2004), o crescimento folicular é caracterizado pela fase independente de gonadotrofinas e fase dependente. A fase independente define-se pelo crescimento dos folículos antrais até o diâmetro de 4 mm na ausência de FSH e LH, e ação de fatores locais como fatores de transformação de crescimento (TGF β), fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs), inibina, ativina e folistatina (SPICER e STEWART, 1996; SUGIURA et al., 2007). Segundo GONG et al. (1996), a fase de crescimento folicular dependente de gonadotrofinas inicia quando os folículos atingem 4 mm e estende-se até 8 mm de diâmetro. Neste estágio de crescimento os folículos são dependentes de FSH e independente de LH. No entanto, folículos maiores de 9 mm tornam-se gradualmente responsivos ao LH endógeno ou ao FSH exógeno (GONG et al., 1996).

Segundo GINTHER et al. (1997), a onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases: recrutamento, divergência, dominância e atresia ou ovulação do folículo dominante. A emergência de uma onda folicular está associada ao aumento transitório nas concentrações plasmáticas de FSH e término do período de independência folicular aos hormônios gonadotróficos. Essa etapa é caracterizada pela retomada do crescimento de um grupo de 5 a 20 folículos terciários que possuem 3 a 5 mm de diâmetro e sofrem a ação do FSH (ADAMS et al., 1992). O FSH liga-se aos seus receptores (FSH-R) localizados nas células da granulosa (RICHARDS et al., 1998). A elevação transitória do FSH no início da emergência folicular determina o aumento da atividade das enzimas aromatasas (P450arom e CYP19) localizadas nas células da granulosa, que atuam convertendo andrógenos oriundos das células da teca em estrógenos, e que promove o aumento da taxa de crescimento folicular. O aumento do tamanho folicular estimula a produção de estradiol e inibina que pelo mecanismo de *feedback* negativo sinalizará à hipófise anterior para redução da concentração de FSH circulante (SUNDERLAND et al., 1994). Desta forma, ocorre a divergência e um folículo torna-se dominante, dando continuidade ao seu crescimento, em detrimento da atresia dos outros folículos que foram recrutados na mesma onda. Segundo GINTHER et al. (2000), o folículo dominante aumenta a responsividade ao LH e continua o seu crescimento após a diminuição do FSH. Os receptores do LH (LH-R) estão localizados nas células da teca e granulosa nos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Entretanto, com o

crescimento dos folículos, os receptores de LH multiplicam-se nas células da teca e, após a seleção da dominância, tornam-se presentes nas células da granulosa, permitindo que o folículo dominante mantenha a produção de estradiol e o seu crescimento até a ovulação mesmo em baixas concentrações de FSH (IRELAND e ROCHE, 1983; XU et al, 1995).

O desenvolvimento do folículo dominante pode ser dividido em três fases: crescimento, estática e regressão. Segundo SILCOX et al. (1993), a fase de crescimento folicular ocorre da emergência (3 a 5 mm) da primeira onda folicular e perdura até o sexto ou oitavo dia após o início da onda. Após o folículo atingir o platô de crescimento devido ao *feedback* positivo do LH, altos níveis de estrógeno e inibina, inicia-se a fase estática onde ocorre pausa do crescimento folicular e dominância do folículo de maior diâmetro, causando atresia dos folículos subordinados (GINTHER et al., 1989b). Portanto, a fase de crescimento é o período que decorre da emergência de uma nova onda até o momento em que o diâmetro do folículo cessa o seu crescimento. A fase estática compreende o período em que o folículo não altera o seu diâmetro, perdurando até o momento em que se inicia a fase de regressão ou a fase de divergência, caracterizada como a etapa da seleção que define a dominância folicular. O folículo dominante pode ser definido como aquele que está 2 mm maior do que os folículos subordinados (SIROIS e FORTUNE, 1990).

O processo de crescimento e de atresia dos folículos perdura enquanto o corpo lúteo se mantiver funcional, o que ocorre mesmo durante a gestação (GINTHER et al, 1989a). Entretanto, quando não há o reconhecimento materno da gestação através da secreção de interferon-tau (IFN- τ), desencadeia-se o processo de luteólise (THATCHER et al., 2001). A partir da luteólise do corpo lúteo ocorrerá a queda das concentrações de progesterona em níveis basais e coincidirá com a grande quantidade de estradiol produzido pelo folículo dominante. O estradiol produzido irá por meio de *feedback* positivo desencadear a liberação de GnRH-LH, resultando em um pico de LH que resultará na maturação final e ovulação do folículo dominante (FORTUNE et al., 1994).

A evolução da ultrassonografia possibilitou o aprofundamento dos estudos sobre dinâmica folicular e a confirmação das teorias sobre o crescimento de ondas foliculares durante o ciclo estral em bovinos. Segundo PIERSON e GINTHER (1988) e SAVIO et

al. (1988), o ciclo estral bovino pode ser composto de duas a quatro ondas de crescimento folicular, no entanto, a maioria dos animais possuem duas ou três ondas, originando o folículo ovulatório somente na última onda.

Ciclos de duas ondas caracterizam-se por terem a primeira onda detectada no dia da ovulação, denominado dia 0. A partir deste momento há o crescimento dos folículos durante 6 a 8 dias, fase de crescimento. A fase estática decorre por mais 6 dias e posteriormente ocorrem a regressão folicular ou a ovulação. A segunda onda folicular, em média, é identificada 10 dias após o início do ciclo. Ciclos com três ondas têm em média o início das respectivas ondas nos dias 0, 9 e 16. Folículos dominantes ovulatórios são normalmente determinados como folículos das últimas ondas foliculares de ambos os ciclos estrais, ou seja, com duas ou três ondas. A ocorrência da atresia folicular se dá pelo elevado nível de progesterona, que promove um bloqueio no eixo hipotalâmico-hipofisário e, conseqüentemente, na liberação de GnRH e LH, inibindo o estímulo para a ovulação dos folículos das ondas iniciais (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988). Segundo GINTHER et al. (1989b), esta diferença observada entre a quantidade de ondas de crescimento folicular está relacionada à duração do ciclo. Animais com ciclos de duas ondas apresentam menor intervalo entre a emergência folicular e o início da regressão do corpo lúteo e menor intervalo interovulatório (16,5 e 19,2 dias) em relação a animais que apresentam três ondas foliculares (20,4 e 22,8 dias).

O sistema IGF (fatores de crescimento semelhante à insulina) desempenha papel importante na seleção do folículo dominante (BURATINI Jr., 2007). Estes fatores de crescimento têm ação sinérgica ao FSH promovendo o crescimento folicular e a produção de estradiol (FORTUNE et al., 2004). O IGF-1 e o IGF-2 ativam os receptores de IGF tipos 1 e 2, presentes nas células da camada da granulosa e da teca, respectivamente (BURATINI Jr., 2007). Os níveis de IGF total não são diferentes no fluido folicular de folículos dominantes em relação aos folículos subordinados, mas os níveis de IGF-I livre são maiores no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, o que reforça a ideia de que o sistema IGF pode atuar no processo de seleção do folículo dominante (BEG et al., 2002).

Além da regulação dos processos de seleção e dominância folicular, fatores como Kit-Ligante, IGF-I, fator de crescimento epidérmico (EGF) e fibroblástico básico

(FGFb), ativina, inibina, folistatina e as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) são também responsáveis pelo processo de morte celular nos diferentes estágios foliculares (ARAÚJO et al., 2010). A ativina pode aumentar a produção de estradiol no fluido folicular, enquanto a folistatina inibe a ação da ativina, alterando o mecanismo de *feedback* do estradiol sobre o eixo hipotálamo-hipófise impedindo os estímulos para o crescimento folicular. A inibina produzida nas células da granulosa possui feedback negativo sobre a hipófise anterior, suprimindo a secreção do FSH (PHILLIPS e DE KRESTSER, 1998). Desta forma, é provável que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem à atresia irá decidir se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (MAGALHÃES et al., 2009).

2.2 ASPECTOS DO RECONHECIMENTO E MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o concepto sinaliza sua presença ao útero materno. Em bovinos a sinalização acontece no período inicial da gestação, sendo vital a intervenção do embrião para a manutenção do corpo lúteo através da atenuação da secreção luteolítica de prostaglandina F2-alfa (PGF2 α). Para que a gestação tenha o desenvolvimento esperado, é necessário que se mantenha em atividade o corpo lúteo estabelecido após a ovulação. A seguir serão detalhados os fenômenos relacionados ao reconhecimento materno e manutenção da gestação.

2.2.1 Reconhecimento materno da gestação

O período embrionário inicia-se na concepção e termina nos estágios finais da diferenciação sexual, por volta de 42 dias na espécie bovina. Esse período é seguido pelo período fetal, que se encerra no término da gestação (COMMITTE, 1972). Conforme a literatura, o principal desafio do estabelecimento da prenhez na espécie bovina ocorre no período embrionário, entre os dias 15 e 19 após a fecundação, período que posteriormente foi designado de “período crítico” (BINELLI et al., 2001). DISKIN e SREENAN (1980) relataram que falhas de fecundação e desenvolvimento embrionário até o oitavo dia pós-fecundação são responsáveis por 10% dos casos de falhas

reprodutivas, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-fecundação contribuem com mais de 30% dos casos. Segundo SANTOS et al. (2004), a maioria das mortes embrionárias ocorrem logo após a fecundação, 30% no dia 7, 40% entre os dias 8 e 17, e 24% entre os dias 17 e 24 após a inseminação artificial.

Durante o período crítico, em fêmeas bovinas não fecundadas ou com concepto (embrião e membranas associadas) incapaz de bloquear a luteólise, ocorre a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (CL). Esse evento fisiológico determina o início de um novo ciclo estral. Entretanto, para haver a manutenção da prenhez, deve ocorrer o bloqueio da luteólise e a manutenção da secreção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo. Esse processo é conhecido como reconhecimento materno da gestação e pode ser definido como o processo pelo qual o concepto sinaliza sua presença ao útero materno, prolongando a vida do corpo lúteo e mantendo a gestação a partir de uma comunicação bioquímica que se estabelece entre o concepto e o tecido endometrial (SPENCER e BAZER, 2004). Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de IFN- τ . Nos bovinos, a secreção ocorre entre o 12º e o 26º dia, com pico entre os dias 15 e 16 (FARIN et al., 1990; ROBERTS, 1991; ROBERTS et al., 1991). Como resposta, o IFN- τ impede a secreção de PGF2 α a partir da inibição da transcrição de receptores de estrógenos (ER) (SPENCER & BAZER, 1996) e ocitocina (OTR) (SPENCER & BAZER, 1996; CHEN et al., 2006) no endométrio. O IFN- τ é um produto secretado em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do concepto de ruminantes antes da implantação (FARIN et al., 1989; GRAY et al., 2002). É classificado como interferon do tipo I e sua principal função é evitar o retorno à ciclicidade, preservando o funcionamento do corpo lúteo durante a gestação (ROBERTS et al., 2008).

2.2.2 Mecanismos de ação do IFN- τ

O mecanismo geral pelo qual o IFN- τ inibe a regressão do CL é pela supressão da liberação pulsátil de PGF2 α endometrial a partir da sua ligação aos receptores de interferon tipo I (BINELLI et al., 2001). O IFN- τ produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para OTR e ER no epitélio luminal do endométrio (LAMMING et al., 1995; SPENCER e BAZER,

1995), evitando assim, a liberação de pulsos luteolíticos de $\text{PGF2}\alpha$. Conforme SPENCER E BAZER (1995), a elevação da expressão dos genes para OTR e ER detectados em fêmeas ovinas cíclicas entre os dias 11 e 17 pós-estro não ocorrem em fêmeas gestantes ou em fêmeas cíclicas que receberam infusão uterina de $\text{IFN-}\tau$ (SPENCER et al., 1995). A hipótese levantada é que a inibição de ER promovida pelo $\text{IFN-}\tau$ inibe o *feedback* positiva sobre os OTR. Desta forma, a ocitocina de origem hipofisária não terá possibilidade de promover a liberação dos pulsos de $\text{PGF2}\alpha$ necessários para luteólise.

Em fêmeas bovinas já foram observados o efeito do $\text{IFN-}\tau$ na inibição da síntese de $\text{PGF2}\alpha$ em células endometriais epiteliais (DANET-DESNOYERS et al., 1994; XIAO et al., 1998). Entretanto, a relação entre $\text{IFN-}\tau$, ER e OTR não é bem clara quanto em ovinos. FUCHS et al. (1990) e JENNER et al. (1991), observaram diferenças significativas na expressão de OTR endometrial entre as fêmeas bovinas prenhes e cíclicas. ROBINSON et al. (2001) sugerem que o $\text{IFN-}\tau$ possa inibir a expressão de OTR no endométrio. HORN et al. (1998) e LEUNG et al. (2001), observaram em explantes endometriais que o $\text{IFN-}\tau$ recombinante inibe a expressão de OTR. Estes trabalhos sugerem que o $\text{IFN-}\tau$ secretado pelo concepto suprime a expressão de OTR endometrial. ROBINSON et al. (2001) estudaram a expressão de receptores para ocitocina (OCT), estrógeno (E2) e progesterona (P4) no endométrio bovino durante o ciclo estral ou período inicial da gestação. Nesse estudo, não foi observada a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para OTR entre os dias 12 e 18 após o estro no endométrio de fêmeas bovinas gestantes. A presença de um concepto não promoveu diferença na expressão de RNAm para ER no epitélio endometrial, nas glândulas superficiais ou no estroma subepitelial entre os dias 12 e 14 pós-estro. Entretanto, entre os dias 16 e 18 após a fecundação, os autores observaram aumento nas concentrações de RNAm para ER no epitélio luminal de fêmeas cíclicas, enquanto que em fêmeas gestantes houve um declínio, não sendo identificado RNAm para ER no 18º dia. Esses resultados indicam que a inibição de OTR promovida pelo $\text{IFN-}\tau$ não está relacionada temporalmente à expressão de ER nas fêmeas bovinas e que em fêmeas bovinas prenhes ocorre o bloqueio da secreção da $\text{PGF2}\alpha$, inibindo a expressão de receptores de

ocitocina e estrógenos no endométrio após o reconhecimento materno da gestação, diminuindo os efeitos do estradiol sobre o endométrio.

2.2.3 Formação do corpo lúteo e a relação com a luteólise

A formação do corpo lúteo se dá a partir da ovulação de um folículo, sendo caracterizado como uma glândula temporária devido à produção e secreção de progesterona durante a fase luteal denominada diestro (MCCRACKEN et al., 1999; NISWENDER et al., 2000). FITZ et al. (1982) e NISWENDER et al. (1985), estudaram a morfologia tecidual do corpo lúteo em ovinos e observaram a presença de dois tipos de células esteroidogênicas, as células grandes e as células pequenas. Posteriormente, KENNY et al. (1989) estudaram a funcionalidade destas células e identificaram que as células luteais grandes sem o estímulo de agentes luteotróficos secretam aproximadamente sete vezes mais progesterona do que as células pequenas.

Aproximadamente no 16º ao 18º dia do ciclo estral, ao final da fase luteal (diestro), a progesterona causa inibição de seus receptores, determinando o retorno da ação estrogênica no hipotálamo e endométrio, levando a um rápido aumento na expressão de ER no útero (SPENCER e BAZER, 1996). O aumento dos níveis de estrógeno determina o aumento da expressão de OTR no endométrio e a liberação de ocitocina pela hipófise posterior (SPENCER e BAZER, 1996). A ligação da ocitocina em seus receptores estimula a síntese e secreção de $PGF2\alpha$ responsável pelo início da luteólise (WATHES e LAMMING, 1995). Em fêmeas bovinas a transferência da $PGF2\alpha$ do útero aos ovários ocorre pelo mecanismo de contra-corrente estabelecido pela artéria ovariana em aposição à veia uterina (GINTHER, 1974). Conforme MCCRACKEN et al. (1973), após a injeção de $PGF2\alpha$ na veia uterina de ovelhas, a substância passa diretamente para a artéria ovariana ipsilateral.

Conforme HAYASHI et al. (2003) e AROSH et al. (2004), prostaglandinas luteais podem contribuir para a autorregulação da atividade do corpo lúteo. Os autores sugerem o funcionamento de um sistema luteal de metabolismo, transporte e sinalização de $PGE2$ e $PGF2$. O estímulo luteal promovido pela $PGF2\alpha$ aumenta a liberação de ocitocina luteal, que potencializa a liberação de prostaglandina uterina e luteal (FLINT e SHELDRIK, 1982; WATHES e LAMMING, 1995; SHIRASUNA et al., 2007).

2.2.4 Placentação e implantação embrionária

O processo de desenvolvimento e anexação ao endométrio das membranas associadas ao embrião é denominado de placentação (BJÖRKMAN, 1976). Conforme LEISER e KAUFMANN (1994), em bovinos a placentação é do tipo sinepiteliocorial, sendo caracterizada por um processo de implantação levemente invasivo, em que seis camadas teciduais (endotélio materno, tecido conjuntivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo embrionário e endotélio embrionário) estabelecem os limites entre as circulações fetal e materna. Decorrente a placentação transcorre-se a implantação embrionária, processo vital para a existência da comunicação materno-concepto em espécies mamíferas.

A implantação do embrião ao útero materno é um mecanismo de adaptação do conceito, necessário para a nutrição e a manutenção da estrutura embrionária e fetal, durante a gestação (SPENCER et al., 2004). Em fêmeas bovinas, como anteriormente descrito, o processo de reconhecimento materno da gestação ocorre no período pré-implantação. Posteriormente, o embrião continua seu desenvolvimento alongando-se de forma esférica para tubular, formando as membranas embrionárias (SPENCER et al., 2004).

2.3 INFLUÊNCIA HORMONAL SOBRE A MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO

A manipulação hormonal e os efeitos decorrentes sobre a manutenção da gestação são de suma importância em programas de ressincronização da ovulação. Na literatura há diversos trabalhos que relacionam tratamentos hormonais com o aumento da sobrevivência embrionária e, por consequência, o aumento das taxas de prenhez provenientes de programas de IA. Atualmente, com o advento dos programas de ressincronização da ovulação para IATF, tem-se retomado estudos em que se relaciona o impacto da aplicação de diferentes hormônios indutores da sincronização da onda folicular com a manutenção da atividade do corpo lúteo, a produção de hormônios esteróides e a manutenção da gestação. Nesta etapa da revisão, serão descritos alguns aspectos hormonais relacionados à manutenção da gestação.

2.3.1 Importância do corpo lúteo e da progesterona na manutenção da gestação

A progesterona é um hormônio esteróide produzido a partir do colesterol transportado até os ovários através de lipoproteínas (HDL e LDL). O nível plasmático de progesterona tem sido relacionado com a capacidade do corpo lúteo em produzir este hormônio, resultando na manutenção da gestação. Conforme a literatura, o tamanho do corpo lúteo é diretamente relacionado com os níveis de progesterona plasmática, ou seja, quanto maior o tamanho do corpo lúteo maior será a concentração de progesterona (YUNG et al., 1996; SARTORI et al., 2002). Entretanto, pode haver uma diferença temporal entre estes eventos, relata-se que o corpo lúteo apresenta um aumento de tamanho até o 8º e 9º dia do ciclo estral e que a máxima concentração de P4 ocorre entre 13º e 16º dia (TAYLOR e RAJAMAHENDRAM, 1991; MANN, 2009). Ainda, MANN (2009) relata que após o corpo lúteo atingir o ápice do seu crescimento o seu tamanho não reflete mais a esteroidogênese. SANTOS et al. (2001) relataram que o corpo lúteo de baixa qualidade produz menor quantidade de progesterona, podendo afetar as três primeiras semanas de gestação e diminuir a sobrevivência da gestação inicial.

A suplementação exógena de progesterona pode prevenir a baixa concentração deste hormônio na fêmea bovina e prevenir a morte embrionária em vacas e novilhas de leite (STEVENSON e MEE, 1991; EL-ZARJOUNY et al., 2001; VAN CLEEFF et al., 1996). Em vacas de leite, a suplementação de progesterona com implante intravaginal aumentou a taxa de prenhez quando o tratamento foi iniciado a partir do dia 3 após a ovulação (ROBINSON et al., 1989; VAN CLEEFF et al., 1996). Segundo WILMUT et al., (1986), a suplementação de progesterona durante a fase luteal tendeu a aumentar a taxa de prenhez em fêmeas bovinas. Conforme STEVENSON et al. (2003b), tratamentos com implante de progesterona juntamente com estrógenos podem prevenir a morte embrionária mesmo quando aplicados durante o período de estabelecimento da prenhez. Assim como tratamentos que utilizam progesterona, o uso de agentes luteotróficos como hCG também podem ser vantajosos. NASCIMENTO et al. (2012) demonstraram que a utilização de CIDR entre 5º e 19º dia do ciclo estral em vacas holandesas em lactação não melhorou a concentração de progesterona quando

comparado ao grupo controle, porém, a administração de hCG juntamente com CIDR permitiu a elevação da P4 em novilhas.

2.3.2 Influência do estradiol sobre o ambiente uterino

O estradiol ou o 17β -estradiol é um hormônio esteróide produzido a partir do colesterol pelas células da granulosa nos folículos ovarianos. Este hormônio é responsável por várias funções na atividade reprodutiva das fêmeas mamíferas. No entanto, considera-se função básica do estradiol a indução do comportamento estral e o estímulo do pico pré-ovulatório do GnRH. Entretanto, existem dúvidas sobre a ação do estradiol sobre a atividade do corpo lúteo e, conseqüentemente, manutenção da prenhez. ARAUJO et al. (2009) avaliaram se o tratamento com 1,0 mg de benzoato de estradiol durante o diestro (dias 13 e 15 do ciclo estral) poderia estimular a secreção de $PGF2\alpha$ e antecipar a luteólise quando associada com a ablação folicular realizada entre os dias 9 a 17 do ciclo estral. A ablação dos folículos atrasou o início da luteólise e o tratamento com estradiol antecipou a secreção de $PGF2\alpha$. Estes achados evidenciam o papel do estradiol folicular em controlar a ocorrência da luteólise, impedindo a sobrevida do corpo lúteo (HIXON e FLINT, 1987; MCCRACKEN et al., 1999; SILVIA et al., 1991). A secreção de $PGF2\alpha$ é o evento que caracteriza o processo da luteólise e está associada ao aumento dos pulsos de ocitocina da hipófise posterior, ampliados pela ocitocina secretada pelo corpo lúteo durante o processo de luteólise e a ligação da ocitocina aos seus receptores do epitélio endometrial (GINTHER et al., 2007; MCCRACKEN et al., 1999). Entretanto, a capacidade do epitélio endometrial de responder à ocitocina é dependente da ação coordenada do estradiol, da progesterona e seus respectivos receptores (VALLET et al., 1990; SPENCER e BAZER et al., 1995). Durante o início e a metade da fase luteal, a expressão dos receptores de estradiol é suprimida no endométrio, presumindo-se que ocorra ação inibitória pelo aumento da concentração de progesterona (SPENCER e BAZER et al., 1995). Entretanto, durante o final da fase luteal os receptores de estradiol no útero aumentam devido ao decréscimo dos receptores de progesterona e/ou decréscimo da sensibilidade do útero a progesterona (MEYER et al., 1988; ROBINSON et al., 2001), e em parte por causa da auto-regulação do estradiol à expressão dos seus próprios receptores nas células endometriais

(SPENCER et al., 1996; XIAO e GOFF., 1999). Além do mais, a estimulação dos receptores de estradiol uterinos pelo estradiol circulante ou folicular, estimula a síntese de receptores de ocitocina no endométrio, com subsequente indução da ocitocina lútea e secreção de PGF2 α pelo útero (SILVIA et al., 1991; MAN et al., 2001). Os receptores de ocitocina no útero são sintetizados na presença de estradiol circulante após *downregulation* dos receptores de progesterona, que ocorre após a exposição a uma fonte de progesterona por 12 dias em vacas ou 10 a 12 dias em ovelhas (ROBINSON et al., 2001; LAMMING e MANN, 1995). Portanto, conforme LAMMING e MANN, 1995 e MACHADO et al. (2008), é necessário que haja um aumento nos níveis de progesterona (*priming*) para que ocorra a secreção de PGF2 α em resposta ao estradiol. ARAUJO et al. (2009) evidenciaram a associação entre a fase do ciclo estral e a ação do estradiol sobre o desencadeamento da luteólise. Segundo os autores, durante o início da fase lútea (período entre 9° e 15° do ciclo estral) a concentração de estradiol foi maior no dia 9 do que no dia 15, sendo considerada a hipótese que o déficit de receptores de estradiol no útero durante este período possa ser o limitante para que ocorra a luteólise. Em contraste, o atraso da luteólise no final da fase luteal (entre 15° e 21° dia do ciclo estral) pode estar relacionado com a ativação tardia dos receptores de estradiol e não por causa da falta de receptores uterinos. Assim, a associação dos receptores de ocitocina e a subsequente indução da secreção de PGF2 α podem ser determinadas pelo sincronismo entre os receptores endometriais e a concentração circulante de estradiol (início da fase luteal = limitação de receptores de estradiol vs fim da fase luteal = limitação da secreção do estradiol). Contudo, faltam esclarecimentos sobre a associação entre os receptores uterinos de estradiol e ocitocina em ausência do estradiol folicular e a precisa relação temporal entre a aquisição destes receptores, o aumento da circulação de estradiol e a secreção uterina de prostaglandina.

Em um estudo que avaliou o efeito de diferentes doses de benzoato de estradiol (0 mg, 1 mg, 2 mg e 4 mg) sobre a sincronização da emergência de uma onda folicular. E as concentrações circulantes de estradiol e progesterona, BURKE et al. (2003) observaram que apesar das concentrações de estradiol permanecerem aumentadas durante 72 horas após a administração do estradiol, a progesterona não foi afetada pelos tratamentos. Segundo os autores, a concentração de progesterona aumentou do dia 0

($2,0 \pm 0,2$ ng/mL) ao dia 1 ($2,8 \pm 0,2$ ng/mL), posteriormente atingindo um plateau do dia 1 ao 3 ($2,8 \pm 0,2$ ng/mL), demonstrando não ter sido afetada pelos diferentes tratamentos com estradiol. MUNRO e MOORE (1985) avaliaram a administração de 5 mg de benzoato de estradiol em conjunto com um implante de progesterona em diferentes períodos do ciclo estral de novilhas de corte. Os autores observaram que a aplicação de estradiol no dia 17 do ciclo estral induziu a queda da concentração de progesterona de forma evidente 2 dias após o tratamento, sendo inferior ao grupo controle. Segundo os autores, o benzoato de estradiol pode alterar a taxa de absorção da progesterona exógena modificando a secreção e a vascularidade vaginal, ou a taxa de transporte e metabolismo da progesterona. Os autores também referiram que o efeito depressor do estradiol sobre a progesterona pode ser dependente do estágio do ciclo estral em que o benzoato de estradiol for administrado.

2.3.3 Influência da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as estruturas ovarianas e a produção de progesterona

O hCG é uma gonadotrofina com alta capacidade luteinizante e que pode efetivar a sincronização de uma onda folicular. Considerando esta característica pontual, o uso do hCG tem sido investigado sobre a dinâmica folicular. SCHMITT et al. (1996) postularam que o hCG tem grande capacidade de luteinizar folículos pré-ovulatórios comparado ao GnRH. Os autores observaram que a administração de 1000 UI resultou em maior proporção de novilhas com os folículos ovulados dois dias após o tratamento, em comparação com GnRH, também resultando em maior proporção de novilhas tendo formação de estrutura luteal após o tratamento com 500 ou 1000 UI de hCG comparados com 100 µg de GnRH. Achados similares foram observados por DAHLEN e LAMB (2008), onde uma maior proporção de novilhas Holandesas cíclicas que receberam 1000 UI de hCG ovularam, comparado as que receberam 100 µg de GnRH. STEVENSON et al. (2008) administraram 1000 UI de hCG ou 100 µg de GnRH em vacas lactantes prenhes entre 26 e 71 dias, e observaram maior proporção de vacas com formação de estrutura luteal quando tratadas com hCG (50%) do que GnRH (26%). Segundo DALLEN et al. (2011), a diferença da meia-vida do LH e hCG na circulação sanguínea pode ser o responsável pela maior eficiência no desaparecimento ou ovulação de

folículos grandes em novilhas tratadas com hCG em relação ao GnRH. Quando administrados 3000 UI de hCG em novilhas, foi observada a presença de hCG no plasma 66 horas após a injeção (SCHMITT et al, 1996), enquanto o LH retornou aos níveis de concentração basal 6 horas após a administração de 25 a 200 µg de análogo de GnRH (CHENAULT et al., 1990).

DALLEN et al. (2011) trataram novilhas pré-púberes com 500 ou 1000 UI de hCG e verificaram aumento do volume do corpo lúteo e da concentração de progesterona sérica em relação as novilhas tratadas com 100 µg de GnRH. Corroborando estes resultados, SCHMITT et al. (1996) obtiveram maior concentração de progesterona em novilhas tratadas com 3000 UI de hCG no 5º dia do ciclo estral do que novilhas tratadas com 8 µg de buserelina. Da mesma forma, STEVENSON et al. (2007) testaram a aplicação de hCG no 4º ao 9º após a inseminação em vacas de leite, resultando em maior concentração de progesterona do que o tratamento com GnRH. Em vacas de corte com cria ao pé, a concentração de progesterona foi maior 7 dias após a administração de 2500 UI de hCG em relação ao GnRH (GEARY et al., 2001). Novilhas de corte tratadas com 1500 UI de hCG tiveram aumento do tamanho do corpo lúteo inicial, do corpo lúteo acessório e maior concentração de progesterona comparada com novilhas que receberam 10 µg de buserelina ou 25 mg de LH (MARQUES et al., 2002). Conforme SCHMITT et al., (1996), 8 dias após a administração de 1000UI de hCG intravenosa e 2000 UI de hCG intramuscular, o peso e o número total de células do corpo lúteo induzido pelos tratamentos com hCG foram maiores quando comparado ao corpo lúteo induzido pela administração de 8 µg de buserelina. Entretanto, BURNS et al. (2008) não observaram diferença na proporção de vacas com ovulação induzida e na concentração de progesterona 7 dias após o tratamento com 500 a 3000 UI de hCG ou 100 µg de GnRH em vacas de corte. Da mesma forma, BUTTREY et al. (2010) obtiveram concentração de progesterona e número de estrutura lútea formada similar 7 dias após o tratamento com hCG ou GnRH.

2.4 RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

A ressinchronização consiste na sincronização da ovulação da fêmea bovina que não concebeu após a primeira IATF e tem por objetivo aumentar o número de terneiros

nascidos por IA, eliminar detecção de estro no repasse por IA, diminuir o número de touros necessários para repasse e por consequência controlar os períodos de concepção e parição (STEVENSON et al. 2003b).

Estudos anteriores demonstram que é possível ressincronizar o retorno estral de vacas não prenhes após a primeira inseminação artificial em vacas de corte e leite (STEVENSON et al., 2003b; GALVÃO et al., 2007). No entanto, para evitar a necessidade de detecção de estro para o segundo serviço, tem sido proposto iniciar os protocolos de ressincronização para a segunda IATF no momento do diagnóstico de gestação, entre o 28º e o 32º dia após a primeira IATF (GIORDANO et al., 2012; MARQUES et al., 2012). De forma alternativa, estratégias têm sido estudadas para que os protocolos hormonais sejam iniciados antes do diagnóstico de gestação, enquanto a prenhez da inseminação prévia ainda é desconhecida, entre o 19º e o 23º dia após a primeira IATF (STEVENSON et al., 2003b; COLAZO et al., 2007; CAMPOS et al., 2013, SÁ FILHO et al., 2014). Desta maneira a aplicação de PGF2 α é realizada imediatamente após o diagnóstico das fêmeas não gestantes (GALVÃO et al., 2007). Além de dispensar a detecção de estro para execução do segundo serviço, o manejo de ressincronização da ovulação permite a redução do intervalo entre a primeira e segunda inseminação (CHEBEL et al., 2003).

A ressincronização da ovulação realizada previamente ao diagnóstico de gestação consiste em repetir um protocolo de sincronização da ovulação 7 a 9 dias antes do exame gestacional (BUTTREY et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2014). Imediatamente após a determinação do diagnóstico de gestação segue o protocolo hormonal nas fêmeas não prenhes aplicando o hormônio luteolítico e realizando a indução da ovulação conforme previamente definido (COLAZO et al., 2007; CAMPOS et al., 2013). Segundo demonstrado por SÁ FILHO et al. (2014), a ressincronização pode ser iniciada 22 dias após a primeira IATF, realizando o diagnóstico de gestação sete dias após o início do protocolo (29 dias de gestação), ocorrendo a segunda IATF, 31 dias após a primeira IATF. Contudo, apesar dos benefícios mencionados, pouco se sabe sobre o impacto da manipulação hormonal necessária para a ressincronização da ovulação sobre a atividade luteal, a produção de progesterona e a manutenção da prenhez.

A ressincronização de fêmeas com prenhez desconhecida para a segunda IATF podem ser iniciadas com GnRH, benzoato de estradiol ou hCG (FRICKE et al., 2003; STEVENSON et al., 2003b; BUTTREY et al., 2010). FRICKE et al. (2003) demonstraram que vacas tratadas com GnRH sete dias antes do diagnóstico de gestação não tiveram aumento de perdas gestacionais e também não afetou a fertilidade da segunda inseminação.

Segundo SÁ FILHO et al. (2014), a sincronização de novilhas de corte para a primeira IATF com GnRH ou benzoato de estradiol 22 dias após a IATF não resultaram em diferentes taxas de prenhez (41,5% e 41,9%, respectivamente), porém, a ressincronização com os mesmos hormônios demonstraram resultado favorável para o benzoato de estradiol (49,3%) em relação ao GnRH (37,2%). Entretanto, poucas informações estão disponíveis em relação ao efeito do benzoato de estradiol sobre a prenhez pré-estabelecida quando aplicado no início dos protocolos de ressincronização da ovulação. Estudos anteriores demonstram que o estradiol administrado no meio do ciclo estral (13-14 dias após a inseminação) de vacas de leite e corte para ressincronização do retorno estral poderia comprometer o ambiente uterino para o estabelecimento do embrião ou a habilidade do corpo lúteo em produzir progesterona (EL-ZARKOUNY e STEVENSON et al., 2004; MUNRO e MOORE, 1985) e reduzir a capacidade de manutenção da prenhez da primeira inseminação (COLAZO et al., 2006; CUTAIA et al., 2002). Em vacas de leite, foi observado que o uso de estradiol no início da ressincronização, 23 dias após a primeira IATF, resulta em satisfatória taxa de concepção após a segunda inseminação (CALIERI et al., 2007). Entretanto, os autores não demonstraram se houve efeito negativo do benzoato de estradiol sobre a prenhez pré-estabelecida devido à aplicação do protocolo de ressincronização (CALIERI et al., 2007).

SÁ FILHO et al. (2014) obtiveram aproximadamente 75% de taxa de prenhez acumulada após a ressincronização de novilhas de corte em 32 dias de estação de acasalamento após a realização de duas IATF neste período. Estes resultados demonstram o incremento significativo da taxa de prenhez a partir de programas de ressincronização no início da estação de acasalamento, sendo considerada uma importante ferramenta para aumentar a eficiência reprodutiva em rebanhos de cria.

Segundo os autores (SÁ FILHO et al. 2014), a administração de 1 mg de benzoato de estradiol no dia 22 após a primeira IATF não compromete a prenhez pré-estabelecida. As perdas gestacionais totais relatadas são de 3%, similares a outros estudos (RHINEHART et al., 2009; AONO et al., 2013). A aplicação exógena de estrógenos parece não afetar a habilidade do corpo lúteo em produzir progesterona e a manutenção da gestação durante o período de reconhecimento materno da gestação (14 a 17 dias após a concepção). Assim, o efeito negativo dos estrógenos sobre a gestação não é determinante para induzir a perda gestacional após o período de reconhecimento da prenhez (19 a 24 dias após a primeira inseminação). Conforme a literatura, não há efeito negativo aparente sobre a taxa de prenhez em fêmeas bovinas que receberam a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol (STEVENSON et al., 2003b; MACMILLAN et al., 1997; EL-ZARKOUNY e STEVENSON et al., 2004), ou 0,5 ou 1 mg de cipionato de estradiol (STEVENSON et al., 2003b; EL-ZARKOUNY e STEVENSON et al., 2004) para ressincronização da emergência folicular. Entretanto, administração de 1 mg de benzoato de estradiol (CUTAIA et al., 2002) ou 0,5 mg de 17- β estradiol (COLAZO et al., 2006) utilizados para ressincronizar a onda folicular ou o retorno estral parecem estar associados com a redução da taxa de prenhez da primeira IATF. COLAZO et al. (2007) relataram que apesar de obterem taxas de prenhez abaixo do esperado em seus experimentos, não houve indicação que o tratamento com estradiol tenha sido responsável. Conforme os autores, o diâmetro do corpo lúteo e a concentração de progesterona não foram afetados pelo estradiol. Segundo BUTTREY et al. (2010), o hCG pode ser uma alternativa para iniciar os protocolos de ressincronização. Conforme SCHIMITT et al. (1996) e STEVENSON et al. (2007), o hCG tem capacidade igual ou superior de sincronizar a ovulação quando comparado ao GnRH. Em vacas de corte em lactação, 500 UI de hCG foi tão efetivo quanto 100 μ g de GnRH ao induzir a ovulação (BURNS et al., 2008). BUTTREY et al. (2010) observaram que em vacas de leite 1000 UI de hCG excederam a resposta ovulatória quando comparado ao grupo controle, GnRH e a dose menor de hCG (500 UI).

Conforme os resultados de recentes estudos, as taxas de prenhez provenientes de protocolos de ressincronização da ovulação que utilizam implantes de progesterona, estrógenos ou GnRH, e prostaglandinas, podem ser consideradas satisfatórias quando

aplicados antes do diagnóstico de gestação. CAMPOS et al. (2013) observaram taxas de prenhez na primeira IATF de 54,4%, na segunda IATF 42,3%, totalizando 74,0% de prenhez acumulada em um intervalo de 33 dias em vacas Nelore lactantes ressinchronizadas 23 dias após a primeira IATF utilizando no protocolo benzoato de estradiol, implante de progesterona e prostaglandina. Conforme resultados apresentados por MARQUES et al. (2012), a prenhez em programas de ressinchronização apresenta variação conforme a categoria animal que é aplicada. Em vacas primíparas e secundíparas, a segunda IATF apresentou decréscimo de 18,2 pontos percentuais na taxa de prenhez (34,9%) comparada à primeira IATF (53,1%). Entretanto, as taxas de prenhez de novilhas e vacas pluríparas na primeira IATF foram 58,4% e 56,3%, e na segunda IATF, 52,6% e 52,7%, respectivamente. Estes resultados proporcionaram prenhez acumulada de 80,3%, 69,4% e 79,3% respectivamente para: novilhas, vacas primíparas e secundíparas, e vacas pluríparas. Considerando estes resultados positivos, MARQUES et al. (2012) realizaram uma terceira IATF ou segunda ressinchronização nos primeiros 80 dias de estação de acasalamento. Os autores observaram uma taxa de prenhez final de 91,1%, sendo este o resultado acumulado da primeira IATF (62,5%), segunda IATF ou primeira ressinchronização (57,5%) e terceira IATF ou segunda ressinchronização (44,0%). SÁ FILHO et al. (2014) estudaram a resposta de novilhas de corte submetidas a programas de ressinchronização 23 dias após a IA. Os autores obtiveram taxas de prenhez de 57,1% para primeira e 61,5% de para segunda IATF, proporcionando aproximadamente 75% de taxa de prenhez acumulada nos primeiros 31 dias da estação de acasalamento.

3 ARTIGO 1

EFEITO DA APLICAÇÃO DE BENZOATO DE ESTRADIOL OU DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA EM PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO SOBRE A PREENHEZ DA IATF

Marcos Rosa de Almeida¹, Eduardo Pradebon da Silva¹, João Batista Souza Borges¹,
Amanda Bilha Machado¹, Laís Steffen Gambin¹, Letícia Baumbach¹, Marcelo Maronna
Dias² & Fabrício de Azevedo Velho²

Artigo publicado:

Acta Scientiae Veterinariae, 2015. 43: 1334.

<http://www.ufrgs.br/actavet/43/PUB%201334.pdf> ISSN 1679-9216

Efeito da aplicação de benzoato de estradiol ou da Gonadotrofina Coriônica humana em protocolos de ressincronização da ovulação sobre a prenhez da IATF

[Effects of Estradiol Benzoate or Human Chorionic Gonadotropin for Ovulation Resynchronization Protocols on Pregnancy rate per TAI]

Marcos Rosa de Almeida¹, Eduardo Pradebon da Silva¹, João Batista Souza Borges¹, Amanda Bilha Machado¹, Laís Steffen Gambin¹, Letícia Baumbach¹, Marcelo Maronna Dias² & Fabrício de Azevedo Velho²

¹Unidade de Reprodução de Bovinos, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²M.V. autônomo, Porto Alegre, RS.

CORRESPONDENCE: J.B. Borges [joao.borges@ufrgs.br - Tel.: +55 (51) 3308-6969].

Av. Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia. CEP 91.540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Background: Programs of resynchronization of ovulation have the objective of allowing reinsemination of females that did not get pregnant after fixed time artificial insemination (TAI), in the lowest time interval possible. These protocols are usually composed of administration of estradiol benzoate (EB) concomitant to the insert of progesterone-based (P4) intravaginal implants 22 to 24 days after the first TAI. However, little information is available on the impact of hormonal manipulation in a pre-established pregnancy. The objective of this study was to evaluate if

resynchronization of ovulation, started 24 days after the first TAI, would interfere in the function of the corpus luteum (CL), production of P4, and pre-established pregnancy.

Materials, Methods & Results: For this study, 526 Brangus heifers with ages between 24 and 26 months, were subjected to TAI program in the beginning of the breeding season. Synchronization protocol for the first TAI started with insertion of an intravaginal implant containing 750 mg of P4 and administration of 2 mg of estradiol benzoate (EB) intramuscular (im) on day -9 (D-9). After seven days (D-2), P4 implants were removed, and 150 µg of D-cloprostenol (PGF), i.m., and 1 mg of estradiol cypionate (EC), i.m., were administered. The TAI was performed between 48 and 54 h after removal of the P4 implant (D0). Twenty-four days after the first TAI (D24), heifers were randomly divided into the following experimental groups: Control (n = 167, no treatment), EB (n = 208, 1 mg of EB, i.m.), and hCG (n = 151, 1000 IU of hCG, i.m.). Heifers of EB and hCG groups received a new intravaginal device containing 750 mg of P4 on D24. On day 31 (D31), P4 implants were removed and pregnancy diagnosis were performed by ultrasound. Pregnancy rates from the first TAI on D31 were 58.7% (98/167), 53.4% (111/208) and 52.9% (80/151) respectively for groups Control, EB and hCG. Heifers diagnosed as non-pregnant received 150 µg of PGF, i.m., and 1 mg of EC, im, and the second TAI was performed 48 to 54 h after removal of the implant (D33). On D31, subgroups of pregnant heifers of each experimental group were randomly selected to determine of area of CL and serum concentration of P4: Control (n = 13), EB (n = 26), and hCG (n = 24). The area of CL was significantly greater ($P < 0.05$) in group hCG (3.42 ± 0.76 cm²) as compared to groups EB (2.44 ± 0.57 cm²) and Control (2.61 ± 0.61 cm²). Similarly, serum concentration of P4 was significantly higher ($P < 0.05$) in group hCG (12.43 ± 3.48 ng/mL) as compared to EB (6.92 ± 3.04 ng/ml) and Control (7.29 ± 2.45 ng/mL) groups.

Discussion: The use of EB and hCG in programs of resynchronization of ovulation 24 days after TAI did not interfere with the result of pre-established pregnancy. It is likely that the mechanism of action of EB does not affect luteal activity, production of P4, and consequently, has no negative effect in maintenance of pregnancy in protocols of

resynchronization of ovulation. Treatment with hCG increased the area of CL and production of P4; however, this effect did not favor pregnancy rates on the first TAI.

Keywords: heifers, TAI, resynchronization of ovulation, pregnancy.

Descritores: novilhas, IATF, ressincronização da ovulação, prenhez.

INTRODUÇÃO

Os programas de ressincronização da ovulação em bovinos de corte têm como objetivo possibilitar a segunda inseminação artificial a tempo fixo (IATF) em fêmeas não gestantes da primeira inseminação no menor intervalo de tempo possível [20,21]. Os protocolos de ressincronização têm sido delineados utilizando conjuntamente um implante intravaginal de progesterona (P4) e benzoato de estradiol (BE) 22 a 24 dias após a primeira IATF. Sete a oito dias após o início do protocolo, os implantes de P4 são removidos e, após o diagnóstico precoce de gestação por ultrassonografia, as fêmeas não gestantes recebem o luteolítico e um indutor de ovulação, sendo inseminadas 31 a 33 dias após a primeira IA [6,20].

Entretanto, informações sobre o efeito do BE na atividade do corpo lúteo (CL), concentração sérica de P4 e manutenção da gestação em protocolos de ressincronização ainda são limitadas. Como alternativa ao uso do BE, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode ser utilizada, considerando sua capacidade de induzir ovulação e sincronizar uma nova onda folicular [5]. Além disto, o uso do hCG pode aumentar a área do CL [4], elevar a concentração da P4 sérica [12] e ter efeito positivo na manutenção da prenhez pré-estabelecida, quando utilizado em protocolos de ressincronização da ovulação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a aplicação do protocolo de ressincronização da ovulação, iniciado 24 dias após a primeira IATF, combinando implante intravaginal de P4, 1 mg de BE ou 1000 UI de hCG, interfere na função do CL gravídico, na produção de P4 e na taxa de prenhez da primeira IATF.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização e animais

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva (Novembro/2014 a Janeiro/2015) na região ecofisiográfica da Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul (RS), coordenadas geográficas 29°59'23'' latitude sul e 52°22'41'' longitude oeste de Greenwich. O clima desta região é classificado como Cf, temperado úmido.

Neste estudo, foram utilizadas 526 novilhas Brangus (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), entre 24 a 26 meses de idade e com peso corporal mínimo de 300 kg. O escore de condição corporal (ECC) foi determinado no início do protocolo de ressincronização (dia 24) numa escala de 1 a 5 (1 = muito magra e 5 = excessivamente gorda).

Protocolo de sincronização da primeira IATF

No início da estação reprodutiva, as novilhas foram submetidas a um protocolo de IATF. O tratamento iniciou com a inserção de um implante intravaginal impregnado com 750 mg de P4 (Prociclar[®])¹ e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Benzoato HC[®])¹ (im), no dia -9 (D-9). Após sete dias (D-2), o implante foi removido, sendo aplicados via im 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan[®])¹ e 1 mg de cipionato de estradiol (CE, Cipionato HC[®])¹. A IATF foi realizada entre 48 a 54 h após a retirada do implante (D0).

Protocolo de ressincronização da segunda IATF

Vinte e quatro dias após a primeira IATF (D24) as novilhas foram divididas aleatoriamente em três grupos: Controle (n = 167, sem tratamento), BE (n = 208, 1 mg de BE, im) e hCG (n = 151, 1000 UI de hCG, im). No mesmo dia, as novilhas do grupo BE e hCG receberam um implante intravaginal com 750 mg de P4. Sete dias após (D31), o dispositivo de P4 foi removido e realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia. As novilhas não gestantes receberam 150 µg de D-cloprostenol (im) e 1 mg de CE (im). A segunda IATF foi realizada 48 a 54 h após a retirada do implante (D33).

Exame ultrassonográfico

O diagnóstico de gestação foi realizado no D31 por ultrassonografia transretal, utilizando um transdutor linear de 5 MHz (Chison 8300 Digital[®])². Também no D31, três subgrupos (Controle, n = 13; BE, n = 26 e hCG, n = 24) contendo apenas novilhas gestantes foram aleatoriamente formados para determinar a área do CL. O cálculo da área do CL foi realizado a partir da fórmula $A = \pi.R^2$, onde o raio (R) foi determinado como 0,5 x diâmetro do CL. Para os CL que apresentaram cavidade, a área da cavidade foi calculada e subtraída da área total do CL. A área do CL acessório foi somada a do CL pré-existente para determinação da área total.

Coleta de sangue e concentração sérica de P4

No D31, as novilhas gestantes dos subgrupos Controle, BE e hCG foram submetidas a coleta de sangue para determinar a concentração sérica de P4. A coleta de sangue foi realizada através da punção da veia coccígea caudal com tubos a vácuo de 10 mL contendo ativador de coágulo (Vacutainer[®])³. As amostras foram refrigeradas por aproximadamente 1 h, centrifugadas (2000 g x 10 min), sendo o soro envasado em tubos eppendorf e armazenados a -20°C para posterior análise. As concentrações séricas de P4 foram mensuradas através de *kit* comercial de quimioluminescência (Immulite 2000 Immunoassay System[®])⁴, seguindo recomendações do fabricante. A sensibilidade do ensaio foi de 0,1 ng/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 7,9% e 10,6%, respectivamente.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS versão 18.0. A variável categórica prenhez, representada pela taxa de prenhez de cada grupo estudado, foi analisada pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis contínuas (escore de condição corporal (ECC), área do CL e concentração sérica de P4) foram analisadas pelo teste de Tukey. As variáveis contínuas, área do CL e concentração sérica de P4, foram submetidas à avaliação de associação de variáveis através da Correlação de Pearson. Os grupos tratamento BE, hCG e o escore de condição corporal foram inseridos em um modelo de regressão logística utilizando o módulo Generalized Linear Model (GLM)

para identificar o efeito dos tratamentos BE e hCG, e do ECC sobre as taxas de prenhez. A variação da resposta prenhez foi analisada com base no seguinte modelo de regressão logística:

$P_i = \exp(y_{ij}) / [1 + \exp(y_{ij})]$, em que P_i é a probabilidade da i -ésima vaca estar prenhe e $y_{ij} = m + \text{ECC} + \text{BE} + \text{hCG} + \text{erro}$.

Foi considerado o nível de confiança de 95%.

RESULTADOS

O ECC determinado no D24 foi de $3,06 \pm 0,45$; $3,30 \pm 0,45$ e $3,24 \pm 0,45$ para os grupos Controle, BE e hCG respectivamente, sendo o primeiro estatisticamente inferior aos demais ($P < 0,05$).

As taxas de prenhez no D31 dos grupos Controle (58,7%, 98/167), BE (53,4%, 111/208) e hCG (52,9%, 80/151) não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 2). Conforme as análises realizadas por regressão logística, não houve efeito significativo na interação entre os tratamentos e o ECC sobre a taxa de prenhez ($P > 0,05$).

No D31, as novilhas prenhes do grupo hCG apresentaram maior área do CL ($P < 0,05$) quando comparados com as novilhas prenhes dos grupos Controle e BE (Tabela 1). Da mesma maneira, a concentração sérica de P4 nas novilhas prenhes no D31 foi maior para o grupo hCG ($P < 0,05$) em relação aos grupos Controle e BE (Tabela 1).

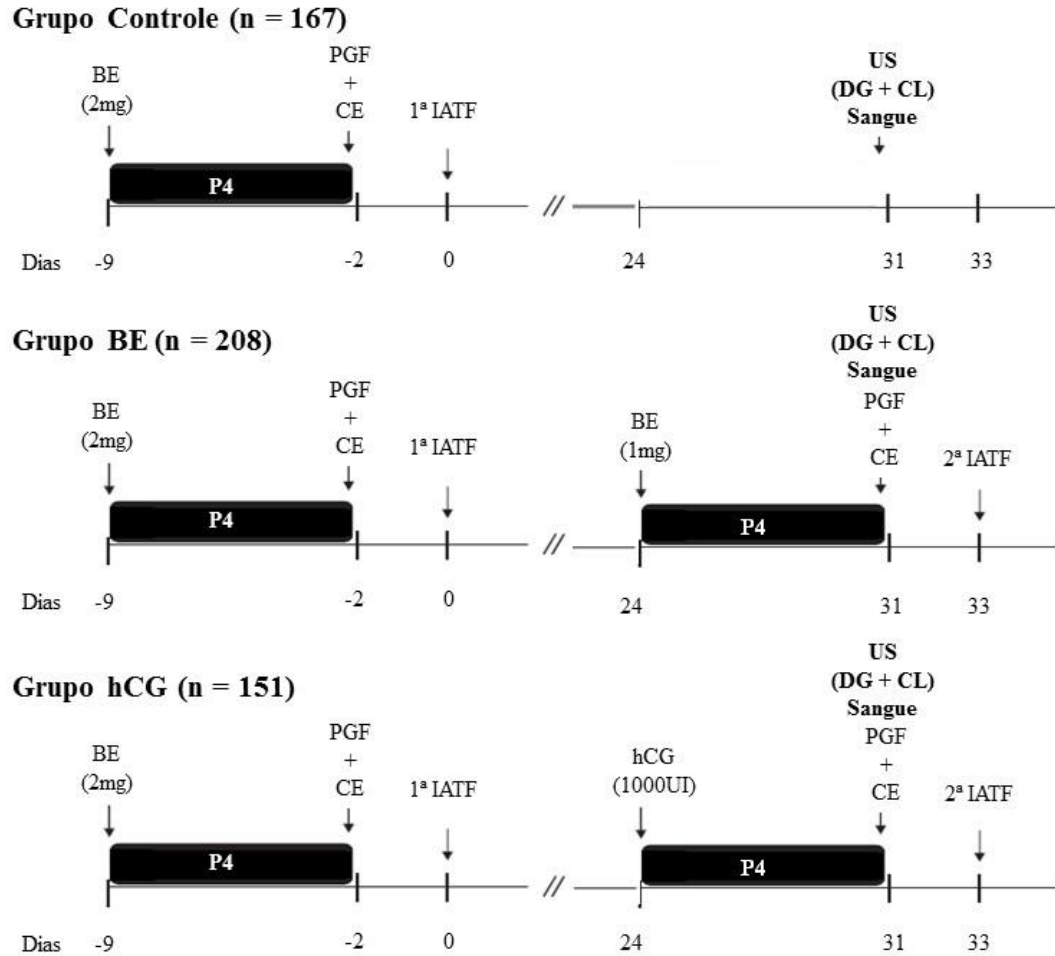


Figura 1. Diagrama do protocolo de sincronização da ovulação para a primeira IATF e do protocolo de ressincronização da ovulação para a segunda IATF, aplicação de BE ou hCG, avaliação ultrassonográfica (US). DG: diagnóstico de gestação; CL: medida da área do CL e coleta de amostras de sangue. hCG: gonadotrofina coriônica humana; BE: benzoato de estradiol; CE: cipionato de estradiol; PGF: D-cloprostenol; DG: diagnóstico de gestação.

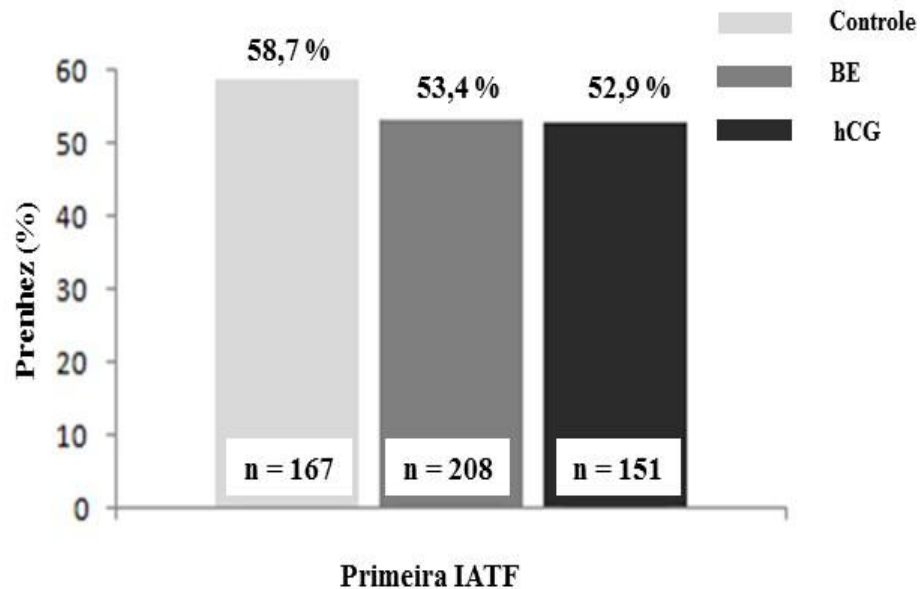


Figura 2. Taxas de prenhez de novilhas Brangus submetidas a protocolos de ressinchronização iniciados no dia 24 após a primeira IATF, dos grupos: Controle (sem tratamento); BE (1 mg de benzoato de estradiol) e hCG (1000 UI de gonadotrofina coriônica humana).

Tabela 1. Efeito da aplicação de protocolos de ressinchronização da ovulação (D24) sobre a área do corpo lúteo (média \pm desvio padrão, cm^2) e a concentração sérica de progesterona (média \pm desvio padrão, ng/mL) de novilhas Brangus prenhes (D31).

Grupo	Número	Área do corpo lúteo (cm^2)	Concentração de progesterona (ng/mL)
Controle	13	$2,61 \pm 0,61^a$	$7,29 \pm 2,45^a$
BE	26	$2,44 \pm 0,57^a$	$6,92 \pm 3,04^a$
hCG	24	$3,42 \pm 0,76^b$	$12,43 \pm 3,48^b$
Total	63	$2,85 \pm 0,79$	$9,34 \pm 4,10$

^{a,b}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferiram entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que não houve efeito negativo dos tratamentos para ressincronização, BE e hCG no dia 24, sobre a prenhez da primeira IATF (Figura 2). As taxas de prenhez foram compatíveis e mesmo superiores aos resultados apresentados em outros estudos [6,20], demonstrando que a ressincronização antes do diagnóstico de gestação não afeta o estabelecimento da gestação após a primeira IATF.

Em novilhas e vacas de corte *Bos indicus*, o uso de BE no início do protocolo de ressincronização, não determinou diferença nas taxas de prenhez da primeira IATF [6,8]. Estes trabalhos evidenciam que a administração de BE no período entre a IATF e o diagnóstico de gestação não interfere no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos [21]. A aplicação do BE juntamente com uma fonte de P4, controla a frequência de liberação de FSH e dos pulsos de LH, resultando em regressão dos folículos dependentes de FSH/LH e início de uma nova onda folicular [3,18]. O uso combinado destes hormônios tem sido recomendado nos protocolos de ressincronização da ovulação iniciados antes de executar o diagnóstico de gestação [6,20].

No entanto, conforme a literatura [1,15], quando o BE é aplicado durante a fase do diestro, é possível ocorrer a regressão precoce do CL através da ativação da síntese e secreção de prostaglandina PGF. A luteólise provocada pela aplicação de estradiol pode ter como causa a maior sensibilidade do CL com 15 a 17 dias de idade [1,2,19]. Knickerbocker *et al.* [13] avaliaram o fluxo sanguíneo, a síntese e o metabolismo da prostaglandina no útero de vacas tratadas com 17- β estradiol, observando aumento destes parâmetros relacionados com a luteólise depois de 6 horas. Também foi demonstrado haver diferenças significativas nas taxas de prenhez da primeira inseminação em novilhas submetidas à ressincronização de estro com BE e P4 13 dias após a primeira IA [7,9]. Nestes casos, observa-se comprometimento do CL identificado pela menor produção de P4 após a aplicação de estradiol [11,15].

Nestes protocolos de ressincronização do retorno estral, o CL presente possui 11 dias a menos do que o CL no 24º dia após a IATF, estando mais próximos do período crítico de indução da luteólise [2,9]. Robinson *et al.* [19] caracterizaram a expressão dos receptores de P4, E2 e ocitocina no ciclo estral e início da gestação de bovinos, não estabelecendo associação direta entre os receptores de ocitocina, responsáveis pela ativação da luteólise, e os receptores de E2. Segundo estes autores, a expressão de receptores de E2 é menor no endométrio de vacas gestantes. A partir destas relações, não há associação direta da regulação dos receptores de ocitocina com a expressão dos receptores de E2 e a indução da luteólise.

Neste estudo, as áreas dos CL's e as concentrações séricas de P4 (Tabela 1) não diferiram entre as novilhas tratadas ou não com 1 mg de BE 24 dias após a primeira IATF. Resultados semelhantes foram relatados por Colazo *et al.* [8] e Stevenson *et al.* [21] que também não identificaram redução da função lútea após o uso de BE em protocolos de ressincronização de estros.

Considerando a possibilidade de BE induzir a luteólise do CL gestacional, utilizou-se como alternativa para iniciar o protocolo de ressincronização, a aplicação de 1000 UI de hCG. O hCG é um hormônio com capacidade de induzir a ovulação do folículo dominante [5,10], a formação de um CL acessório [22] e o aumento da área do CL através do seu efeito luteotrófico [4,5], favorecendo a produção de P4 pelo aumento do número de células luteais [10,12,16,17]. Estas características são desejáveis nos protocolos de ressincronização da ovulação realizados antes do diagnóstico de gestação, por não afetarem o desenvolvimento embrionário e placentário [14]. No presente trabalho, a aplicação de hCG determinou um aumento significativo na área do CL e na produção de P4, mas não foi observada diferença na taxa de prenhez em relação ao grupo BE e Controle. A ação do hCG também está relacionada com a indução da ovulação de folículos médios no início da ressincronização, reduzindo a produção de E2 e evitando alterações no ambiente uterino que podem afetar o estabelecimento da prenhez [14,23].

CONCLUSÕES

A utilização do BE para ressincronização da ovulação 24 dias após a IATF não afeta a função luteal, enquanto o uso do hCG determina o aumento da área do CL e da concentração de progesterona sérica no dia 31. A ressincronização para realização de uma segunda IATF aos 33 dias não interfere na manutenção da gestação estabelecida pela primeira IA.

MANUFACTURERS

¹Hertape Calier Saúde Animal. Juatuba, MG, Brazil.

²Chison Medical Imaging Co. Ltd. Wuxi, Jiangsu, China.

³BD Biociences. Franklin Lakes, NJ, USA.

⁴Healthcare Sector. Erlangen, Federal Republic of Germany.

Ethical approval. Os procedimentos descritos estão de acordo com o projeto de número 27706, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS).

Declaration of interest. The authors declare no conflict of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 Araujo R.R., Ginther O.J., Ferreira J.C., Palhão M.M., Beg M.A. & Wiltbank M.C. 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biology of Reproduction*. 81(2): 426-437.

2 Bazer F.W., Wu G., Spencer T.E., Johnson G.A., Burghardt R.C. & Bayless K. 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction*. 16(3): 135-152.

- 3 Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. 1995.** Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*. 43(1): 31-40.
- 4 Borges J.B.S., Thedy D.X., Dias M.M., Velho F.A. & Almeida M.R. 2014.** Administração de Gonadotrofina Coriônica Humana para estimulação da função luteal em vacas de corte lactantes. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42: 1231.
- 5 Buttrey B.S., Burns M.G. & Stevenson J.S. 2010.** Ovulation and pregnancy outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. 73(4): 449-459.
- 6 Campos J.T., Marinho L.S.R., Lunardelli R.A., Morotti F. & Seneda M.M. 2013.** Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 80(6): 619-623.
- 7 Colazo M.G., Kastelic J.P., Mainar-Jaime R.C., Gavaga Q.A., Whittaker R.R., Small J.A., Martinez M.F., Wilde R.E., Veira D.M. & Mapletoft R.J. 2006.** Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*. 65(3): 557-572.
- 8 Colazo M.G., Kastelic J.P., Small J.A., Wilde R.E., Ward D.R. & Mapletoft R.J. 2007.** Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *The Canadian Veterinary Journal*. 48(1): 49-56.
- 9 Cutaia L., Tribulo R., Tegli J., Moreno D. & Bó G.A. 2002.** The use of estradiol and progesterone inserts during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. *Theriogenology*. 57(1): 373.
- 10 Dahlen C.R., Marquezini G.H.L., Larson J.E. & Lamb G.C. 2011.** Human chorionic gonadotropin influences ovarian function and concentrations of progesterone in prepubertal Angus heifers. *Journal of Animal Science*. 89(9): 2739-2749.

- 11 El-Zarkouny S.Z. & Stevenson J.S. 2004.** Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. *Journal of Dairy Science*. 87(10): 3306-3321.
- 12 Garret J.E., Geisert R.D., Zavy M.T. & Morgan G.L. 1988.** Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction & Fertility*. 84: 437-446.
- 13 Knickerbocker J.J., Thatcher W.W., Foster D.B., Wolfenson D., Bartol F.F. & Caton D. 1986.** Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 β in cyclic cattle. *Prostaglandins*. 31(4): 757-776.
- 14 Marquezini G.H.L., Dahlen C.R., Bird S.L. & Lamb G.C. 2011.** Administration of human chorionic gonadotropin to suckled beef cows before ovulation synchronization and fixed-time insemination: Replacement of gonadotropin-releasing hormone with human chorionic gonadotropin. *Journal of Animal Science*. 89: 3030-3039.
- 15 Munro R.K. & Moore N.W. 1985.** Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. *Journals of Reproduction & Fertility*. 73(2): 353-359.
- 16 Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K. & Mcintush E.W. 2000.** Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiological Reviews*. 80(1): 1-29.
- 17 Niswender G.D., Schwall R.H., Fitz T.A., Farin C.E. & Sawyer H.R. 1995.** Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Recent Progress in Hormone Research*. 41: 101-151.
- 18 Price C.A. & Webb R. 1988.** Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology*. 122(5): 2222-2231.
- 19 Robinson R.S., Mann G.E., Lamming G.E. & Wathes D.C. 2001.** Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*. 122(6): 965-979.

20 Sá Filho M.F., Marques M.O., Girotto R., Santos F.A., Sala R.V., Barbuio J.P. & Baruselli P.S. 2014. Resynchro- nization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*. 81(2): 284-290.

21 Stevenson J.S., Johnson S.K., Medina-Britos M.A., Richardson-Adams A.M. & Lamb G.C. 2003. Resynchroniza- tion of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *Journal of Animal Science*.81(7): 1681-1692.

22 Stevenson J.S., Portaluppi M.A., Tenhouse D.E., Lloyd A., Eborn D.R., Kacuba S. & DeJarnette J.M. 2007.Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin- releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*. 90(1): 331-340.

23 Zelinski, M.B., Hirota N.A., Keenan E.J. & Stormshak F. 1980. Influence of exogenous estradiol-17 β on endometrial progesterone and estrogen receptors during the luteal phase of the ovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 23(4): 743-751.

4 ARTIGO 2

DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS DE CORTE ACASALADAS ENTRE 24 A 26 MESES DE IDADE SUBMETIDAS A DOIS PROGRAMAS DE IATF EM 33 DIAS

Marcos Rosa de Almeida¹, Eduardo Pradebon da Silva¹, João Batista Souza Borges¹, Amanda Bilha Machado¹, Laís Steffen Gambin¹, Letícia Baumbach¹, Marcelo Maronna Dias² & Fabrício de Azevedo Velho²

Desempenho reprodutivo de novilhas de corte acasaladas entre 24 a 26 meses de idade submetidas a dois programas de IATF em 33 dias

Reproductive performance of beef heifers aged 24 to 26 months subject at two TAI programs in 33 days

Marcos Rosa de Almeida¹, Eduardo Pradebon da Silva¹, João Batista Souza Borges^{1}, Amanda Bilha Machado¹, Laís Steffen Gambin¹, Letícia Baumbach¹, Marcelo Maronna Dias² & Fabrício de Azevedo Velho²*

¹Unidade de Reprodução de Bovinos, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS

*Endereço para correspondência: joao.borges@ufrgs.br

²M.V. autônomo, Porto Alegre, RS.

RESUMO

Buscou-se avaliar com este experimento o desempenho reprodutivo de novilhas de corte submetidas a duas IATFs nos primeiros 33 dias da estação reprodutiva. Para este estudo, 184 novilhas Brangus com idade entre 24 a 26 meses e peso corporal médio de 361,0±29,2kg foram submetidas a dois programas de IATF no início da estação reprodutiva. O protocolo de sincronização para a primeira IATF começou com a inserção de um implante intravaginal contendo 750 mg de progesterona e a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (i.m.) no dia -9 (D-9). Após sete dias (D-2), os implantes de progesterona foram removidos, e 150 µg de D-cloprostenol (PGF), i.m., e 1 mg de cipionato de estradiol (CE), i.m., foram

administrados. A IATF foi realizada entre 48 e 54 horas após a remoção do implante de progesterona (D0). Vinte e quatro dias após a primeira IATF (D24), as novilhas foram aleatoriamente divididas conforme os hormônios utilizados no programa de ressincronização da ovulação, formando dois grupos experimentais: BE (n = 83, 1 mg de benzoato de estradiol, i.m.) e hCG (n = 101, 1000 UI de hCG, i.m.). Novilhas dos grupos BE e hCG receberam um novo dispositivo intravaginal contendo 750 mg de progesterona no D24. No dia 31 (D31), os implantes foram removidos e o diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado. As taxas de prenhez da primeira IATF no D31 foram de 63,9% (53/83) e 64,9% (65/101), respectivamente, para os grupos BE e hCG. Novilhas diagnosticadas como não gestantes receberam 150 µg de PGF, i.m., e 1 mg de CE, i.m., sendo a segunda IATF realizada em 48 a 54 horas após a remoção do implante (D33). Trinta dias após a segunda IATF (D63), foi realizado o segundo diagnóstico de gestação. As taxas de prenhez da segunda IATF foram 40,0% (12/30) e 22,2% (8/36), respectivamente, para os grupos BE e hCG. Após os dois diagnósticos de gestação foram avaliadas as perdas gestacionais. Foram observadas entre os diagnósticos de gestação dos dias 31 e 63, 9,4% (5/53) e 6,2% (4/65) de perdas gestacionais respectivamente para os grupos BE e hCG. As taxas de prenhez acumulada para os grupos BE e hCG foram, respectivamente, 72,3% (60/83) e 68,3% (69/101). O uso do BE e hCG para ressincronização da ovulação 24 dias após a primeira inseminação não refletiu sobre a taxa de prenhez da primeira IATF. Assim como não interferiu sobre as taxas de prenhez obtidas na segunda IATF, apesar de numericamente inferior. As taxas de prenhez acumulada foram similares e satisfatórias para os primeiros 33 dias da estação de acasalamento. A ressincronização da ovulação com BE ou hCG não interferiu nos índices de perdas gestacionais.

Palavras-chave: novilhas de corte, IATF, ressincronização, perdas gestacionais, taxas de prenhez.

ABSTRACT

This study evaluated the reproductive performance of beef heifers submitted to two TAI in the first 33 days of the breeding season. For this study, 184 Brangus heifers aged 24-26 months and average body weight of 361.00±29.2kg were submitted to two

TAI programs at the beginning of the breeding season. The synchronization protocol to the first TAI started with the insertion of an intravaginal implant containing 750 mg of progesterone and the administration of 2 mg of estradiol benzoate (EB) intramuscular (im) on day -9 (D-9). After seven days (D-2) the progesterone implants were removed, and 150 µg D-cloprostenol (PGF), i.m., and 1 mg estradiol cypionate (EC), i.m., were administered. The TAI was carried out between 48 and 54 hours after removal of the progesterone implant (D0). Twenty-four days after the first TAI (D24), heifers were randomly divided according to the hormones used in ovulation resynchronization program, the following experimental groups trainees: BE (n = 83, 1 mg estradiol benzoate, i.m.) and hCG (n = 101, 1000 IU hCG, i.m.). Heifers of BE and hCG groups received a new intravaginal device containing 750 mg of progesterone in D24. On day 31 (D31), the implants were removed and the diagnosis of pregnancy was performed by ultrasonography. The first TAI pregnancy rates in D31 were 63.9% (53/83) and 64.9% (65/101), respectively, for the BE and hCG groups. Diagnosed as non-pregnant heifers receiving 150 µg PGF, i.m., and 1 mg EC, i.m. and second TAI was carried out in 48 to 54 hours after removal of the implant (D33). Thirty days after the second TAI (D63), the second pregnancy diagnosis was performed. Pregnancy rates of the second TAI were 40.0% (12/30) and 22.2% (8/36), respectively, for the BE and hCG groups. After the two pregnancy diagnosis (days 31 and 63) reproductive losses were evaluated. Reproductive losses rates were respectively 9.4% (5/53) and 6.2% (4/65) for the BE and hCG groups. The cumulative pregnancy rates for BE and hCG groups were respectively 72.3% (60/83) and 68.3% (69/101). The use of BE or BE and resynchronization ovulation 24 days after the first insemination did not reflect on the pregnancy rate of the first TAI. As no effect on pregnancy rates obtained in the second TAI, although numerically lower. The cumulative pregnancy rates were similar and satisfactory for the first 33 days of the breeding season. The resynchronization of ovulation with BE or hCG did not affect the rates of pregnancy loss.

Keywords: beef heifers, TAI, resynchronization, reproductive losses, pregnancy rates.

Introdução

O uso de biotecnologias como a inseminação artificial, tem proporcionado o aumento de ganhos genéticos na produção de terneiros e a otimização do manejo em rebanhos de cria com o maior controle das estações de acasalamento e parição (STEVENSON et al., 2003). A partir dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) busca-se aumentar o número de fêmeas bovinas parindo terneiros produzidos pela inseminação artificial, aumentando a taxa de serviço e reduzindo o intervalo entre as inseminações sem o comprometimento da sobrevivência do concepto (CAMPOS et al., 2013).

A ressincronização da ovulação de fêmeas não gestantes na primeira IATF pode proporcionar o aumento das taxas de prenhez em um curto período de tempo no início da estação de acasalamento e proporcionar altas taxas de prenhez acumuladas ao final da estação de acasalamento (CAMPOS et al., 2013). Estudos prévios têm demonstrado que a ressincronização do retorno estral permite repetir a inseminação de fêmeas não gestantes na primeira inseminação artificial (GALVÃO et al., 2007; BUTTREY et al., 2010). Entretanto, para evitar a necessidade de observação do estro para executar o segundo serviço, tem sido proposto iniciar os programas de ressincronização da ovulação para a segunda inseminação antes do primeiro diagnóstico de gestação. De maneira geral, os protocolos utilizados para ressincronização do estro são os mesmos utilizados para sincronizar a ovulação para a primeira IATF, porém, iniciam 7 a 8 dias antes do primeiro diagnóstico de gestação precoce realizado 28 a 31 dias após a primeira IATF. Assim, a aplicação da prostaglandina é realizada logo após a determinação dos animais prenhes, sem risco de induzir a luteólise indesejada e a perda reprodutiva.

A maioria dos estudos sobre ressincronização de fêmeas bovinas, com prenhez ainda desconhecida, foram realizados com a administração de GnRH para a indução da nova onda de emergência folicular, sendo limitados os estudos sobre a viabilidade de uso do benzoato de estradiol nestes protocolos (CAMPOS et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2014). Estudos relatam que a aplicação de estradiol durante o meio do ciclo estral para ressincronização do retorno estral pode comprometer a capacidade do corpo lúteo em produzir progesterona (MUNRO e MOORE, 1985; EL-ZARKOUNY e STEVENSON, 2004) e implicar na diminuição da taxa de prenhez da primeira inseminação (CUTAIA

et al., 2002). Entretanto, estes autores não apresentaram avaliações da utilização deste hormônio sobre a manutenção da gestação pré-estabelecida. Como alternativa foi utilizado a gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor da nova onda folicular no início dos programas de ressincronização (BUTTREY et al., 2010). Os autores relataram que o hCG poderia induzir um maior número de folículos à ovulação no início do protocolo de ressincronização e, por consequência, aumentar a sincronização da ovulação e a taxa de prenhez após a segunda inseminação. Além do mais, BUTTREY et al. (2010), consideram que o maior número de corpos lúteos auxiliares resultantes da aplicação do hCG pode aumentar a concentração de progesterona nas fêmeas prenhes e reduzir as perdas gestacionais que podem ocorrer devido a manipulação hormonal do protocolo de ressincronização.

O presente estudo objetiva avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas de corte submetidas a protocolos de ressincronização da ovulação com dois indutores de onda folicular diferentes (BE vs hCG) a partir da taxa de prenhez da primeira IATF, taxa de prenhez da segunda IATF, análise das perdas gestacionais e da taxa de prenhez acumulada diagnosticada após as duas inseminações.

Material e Métodos

Localização e animais

O experimento foi realizado durante a estação reprodutiva (Novembro/2014 a Janeiro/2015) na região ecofisiográfica da Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul (RS), coordenadas geográficas 29°59'23'' latitude sul e 52°22'41'' longitude oeste de Greenwich. O clima desta região é classificado como Cf, temperado úmido. Neste estudo, foram utilizadas 184 novilhas Brangus entre 24 a 26 meses de idade e com peso corporal médio de 361,0±29,2kg.

Protocolo de sincronização da primeira IATF

No início da estação reprodutiva, as 184 novilhas foram submetidas a um protocolo de IATF. O tratamento iniciou com a inserção de um implante intravaginal impregnado com 750 mg de progesterona (Prociclar[®]) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Benzoato HC[®]) (i.m.), no dia -9 (D-9). Após sete dias (D-2), o

implante foi removido, sendo aplicados via i.m. 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan[®]) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE, Cipionato HC[®]). A IATF foi realizada entre 48 a 54h após a retirada do implante (D0).

Protocolo de ressincronização da segunda IATF

Vinte e quatro dias após a primeira IATF (D24) as novilhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: BE (n = 83, 1 mg de benzoato de estradiol - Benzoato HC[®], i.m.) e hCG (n = 101, 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana - Vetecor[®], i.m.). No mesmo dia, as novilhas do grupo BE e hCG receberam um implante intravaginal com 750 mg de progesterona (Prociclar[®]). Sete dias após (D31), o implante de progesterona foi removido e realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia. As novilhas não gestantes receberam 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan[®]) (i.m.) e 1 mg de CE (Cipionato HC[®]) (i.m.). A segunda IATF foi realizada 48 a 54h após a retirada do implante (D33). Para as inseminações artificiais propriamente ditas foi utilizado sêmen comercial de touro com fertilidade comprovado por exame andrológico.

Exame ultrassonográfico

Os diagnósticos de gestação foram realizados no dia 31 (D31) e 61 (D61) após a primeira IATF. O primeiro diagnóstico (D31) foi realizado para determinação das novilhas prenhes da primeira IATF. O segundo diagnóstico (D61) foi realizado para determinação das novilhas prenhes da segunda IATF e para confirmação da prenhez da primeira IATF. Portanto, para o diagnóstico de perda reprodutiva, as novilhas diagnosticadas prenhes no primeiro diagnóstico (D31) foram submetidas ao segundo exame ultrassonográfico (D61). Novilhas que não apresentavam estrutura fetal compatível com a idade gestacional de 61 dias eram consideradas não gestantes devido a perda reprodutiva da primeira IATF. Os exames foram realizados por ultrassonografia transretal, utilizando um transdutor linear de 5 MHz (Chison 8300 Digital[®]).

Análise estatística

-*Taxa de prenhez da primeira IATF* foi obtida a partir do número de animais prenhes diagnosticadas no D31 em relação ao número total de animais de cada grupo (BE vs hCG);

-*Taxa de prenhez da segunda IATF* foi obtida a partir do número de animais prenhes diagnosticados no D61 em relação ao número total de animais de cada grupo (BE vs hCG) diagnosticados não gestantes no D31 e que foram submetidos à segunda rodada de IATF;

-*Taxa de perda gestacional* foi obtida a partir do número de animais diagnosticados gestantes de cada grupo (BE vs hCG) no D31 e que não tiveram a prenhez confirmada no segundo diagnóstico de gestação (D61);

-*Taxa de prenhez acumulada* foi obtida a partir do número total de animais prenhes diagnosticados no D31 e D61, descontado o número de animais que perderam a gestação da primeira IATF, em relação ao número total de animais de cada grupo (BE vs hCG);

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 18.0. A variável categórica prenhez (prenhe ou vazia) e perda reprodutiva (sim ou não), representada pela taxa de prenhez e taxa de perda reprodutiva de cada grupo estudado, foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. Foi considerado o nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

Os dados do presente estudo demonstram que não há efeito negativo causado pela aplicação de 1mg de benzoato de estradiol no dia 24 sobre a prenhez da primeira inseminação. Observa-se na Tabela 1 que a taxa de prenhez da primeira IATF para o grupo BE e hCG não apresentam diferença estatística. Apesar de apresentarem resultados inferiores ao do presente estudo, SÁ FILHO et al. (2014) observaram que animais ressincronizados 22 dias após a inseminação prévia usando 1 mg de benzoato de estradiol (41,5%) não apresentaram queda na taxa de prenhez da primeira IATF quando comparados aos animais que receberam 100 µg de GnRH (41,9%). Da mesma forma, CAMPOS et al. (2013) não observaram diferenças nas taxas de prenhez da primeira IATF quando vacas Nelore foram ressincronizadas com 2 mg de benzoato de

estradiol. MUNRO e MOORE et al. (1985) e EL-ZARKOUNY e STEVENSON (2004) observaram que a aplicação exógena de estrógeno pode comprometer a atividade do corpo lúteo em produzir progesterona, induzindo a luteólise e aumentando as perdas gestacionais em fêmeas com prenhez ainda em estabelecimento (COLAZO et al., 2006; CUTAIA et al., 2002). Entretanto, o mecanismo de regulação da luteólise a partir de estrógenos não está bem definido. Presumi-se que o estradiol possa regular o mecanismo da luteólise durante o período de reconhecimento materno que acontece entre os dias 14 e 17 pós-concepção (ROBINSON et al., 2001). Ratificando esta informação, MUNRO e MOORE et al. (1985) relataram que o possível efeito luteolítico do estradiol pode ser dependente da fase do ciclo estral ao qual é aplicado. Considerando que em fêmeas bovinas gestantes ocorra a diminuição da presença de receptores de estrógeno no útero após o reconhecimento materno da gestação (ROBINSON et al., 2001), é provável que o período em que o estradiol foi aplicado no presente estudo não favoreça a manifestação da ação luteolítica do estradiol. Sendo assim, o benzoato de estradiol, *a priori*, não induz a luteólise através da regulação da secreção uterina de prostaglandina como observado em estudos anteriores (MUNRO e MOORE et al., 1985; ARAUJO et al., 2009). Utilizando 1000 UI de hCG em protocolos de ressincronização para o retorno estral em vacas de leite, BUTTREY et al. (2010), observaram taxas de prenhez inferiores as apresentadas na Tabela 1, no entanto, não diferiu dos outros tratamentos utilizados pelos autores. O tratamento com hCG aumenta a concentração de progesterona através da indução de corpos lúteos acessórios (STEVENSON et al., 2007; SCHIMITT et al., 1996) e pelo aumento do número de células luteais secretoras de progesterona (NISWENDER et al., 1986). ALMEIDA et al. (2015) observaram efeito positivo do hCG, administrado 24 dias após a primeira IATF em protocolos de ressincronização da ovulação aplicados em novilhas de corte, sobre a área do corpo lúteo e a concentração sérica de progesterona quando comparado aos grupos benzoato de estradiol e controle ($P < 0,05$). Este efeito luteotrófico do hCG pode ser benéfico para o estabelecimento da prenhez.

Tabela 1. Taxa de prenhez da primeira e da segunda IATF de novilhas de corte conforme os grupos experimentais BE e hCG.

Grupos	Número de animais	Taxa de prenhez da 1 ^a	Taxa de prenhez da 2 ^a
		IATF (%)	IATF(%)
BE	83	63,9 (53/83)	40,0 (12/30)
hCG	101	64,6 (65/101)	22,2 (8/36)

Tabela 2. Taxa de perda gestacional conforme os grupos experimentais BE e hCG.

Grupos	Número de animais gestantes	
	no 1º diagnóstico de gestação	Taxa de perda gestacional (%)
BE	53	9,4 (5/53)
hCG	65	6,2 (4/65)
Total	118	7,6 (9/118)

Assim como observado na taxa de prenhez da primeira IATF (Tabela 1), as taxas de perdas gestacionais medidas entre o 31º ao 61º dia de gestação (Tabela 2) não apresentaram diferença estatística entre os grupos BE e HCG. Apesar de o grupo BE possuir 3,2 pontos percentuais a mais do que o hCG, numericamente a diferença é de um animal, não sendo estatisticamente significativo. FORAR et al. (1995) observaram perdas gestacionais entre 5,2% e 10,6%. DAHLEN et al. (2003) relataram perdas gestacionais entre o primeiro diagnóstico de gestação aos 30-35 dias após a inseminação e o segundo diagnóstico aos 120-125 dias de 11,7%. BUTTREY et al. (2010) relatam perdas gestacionais de 3,5% a 6,6% diagnosticadas entre os dias 39 e 67 pós inseminação. SÁ FILHO et al. (2014) relataram 4,1% de perdas gestacionais entre os dias 30 e 60 após a primeira IATF de animais submetidos a ressincronização da ovulação. Apesar do pequeno número de animais no presente estudo, observa-se que os percentuais de perdas gestacionais apresentados estão dentro da média relatada pela literatura.

A resposta da ressincronização da ovulação para a segunda IATF demonstrou resultado insatisfatório em relação à taxa de prenhez da primeira IATF (Tabela 1), porém são semelhantes aos resultados apresentados pela literatura (SÁ FILHO et al.,

2014; CAMPOS et al., 2013). SÁ FILHO et al. (2014) relataram taxas de prenhez da segunda IATF de 37,2% (BE) e 49,3% (GnRH). CAMPOS et al. (2013) relatam prenhez em vacas de corte a partir da ressincronização de 16,4% a 52,7%. Conforme MARTINEZ et al. (2000), o estradiol é capaz de promover uma boa sincronização da onda folicular para a realização de protocolos de sincronização da ovulação, permitindo altas taxas de manifestação estral e de prenhez à IATF (MARTINEZ et al., 2000). Ainda que o hCG tenha a capacidade de induzir a emergência de uma nova onda folicular e proporcionar uma alta taxa de sincronização do estro (80%) (COSTA et al., 1999; BUTTREY et al., 2010), a taxa de prenhez da ressincronização do grupo hCG foi considerada inferior ao desejável. Possivelmente o dia de aplicação do hCG (dia 24) possa ter influenciado na indução da nova onda folicular, refletindo sobre a taxa de prenhez da segunda IATF. Porém, uma avaliação mais detalhada sobre a dinâmica folicular destes protocolos de ressincronização deve ser realizada para maior entendimento destas possíveis interferências.

Tabela 3. Taxa de prenhez acumulada de novilhas de corte submetidas a dois programas de IATF em 33 dias.

Grupos	Número de		Taxa de prenhez	
	animais	Vazias	Prenhes	acumulada (%)
BE	83	23	60	72,3
hCG	101	32	69	68,3
Total	184	55	129	70,1

Os programas de ressincronização da ovulação proporcionam o aumento da taxa do segundo serviço e reduzem o intervalo entre as inseminações. Conforme observado na Tabela 3 as taxas de prenhez acumulada foram semelhantes e até superiores às relatadas na literatura (CAMPOS et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2014). CAMPOS et al. (2013) obtiveram a partir de programas de ressincronização da ovulação 61,3% a 76,6% de prenhez acumulada nos primeiros 33 dias de estação de acasalamento. SÁ FILHO et al. (2014) relataram aproximadamente 75% de taxa de prenhez acumulada em 32 dias de estação de acasalamento. Desta forma, os programas de ressincronização da ovulação

podem aumentar as taxas de prenhez durante o período inicial da estação reprodutiva em rebanhos de bovinos de corte.

Conclusões

A administração de BE ou hCG no dia 24 para ressincronização da ovulação não interferiu na taxa de prenhez da primeira IATF. Assim como não determinou efeito sobre as taxas de prenhez na segunda IATF, embora numericamente inferiores. A taxa de prenhez acumulada para os grupos BE e hCG foram satisfatórias considerando a realização de duas IATFs nos primeiros 33 dias da estação de acasalamento. A ressincronização da ovulação com BE ou hCG não interferiu nos índices de perdas gestacionais.

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, R.R.; GINTHER, O.J.; FERREIRA, J.C.; PALHÃO, M.M.; BEG, M.A.; WILTBANK, M.C. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biol. Reprod.**, v.81, p.426–37, 2009.

BUTTREY, B.S.; BURNS, M.G.; STEVENSON, J.S. Ovulation and pregnancy outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v.73, p.449–459, 2010.

CAMPOS, J.T.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.80, p.619–623, 2013.

COSTA, D.S.; TORRES, C.A.A.; ANGULO, L.A.M.; JUNQUEIRA, L.A.C.; SILVA, L.A. Sincronização da onda folicular com hcg prévia à indução da luteólise com cloprostenol em bovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.28, n.4, p.701-705, 1999.

CUTAIA, L.; TRIBULO, R.; TEGLI, J.; MORENO, D.; BÓ, G.A. The use of estradiol and progesterone inserts during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. **Theriogenology**, n.58, p.373, 2002.

DAHLEN, C.R.; LAMB, G.C.; ZEHNDER, C.M.; MILLER, L.R.; DICOSTANZO, A. Fixed-time insemination in peripuberal, lightweight replacement beef heifers after estrus synchronization with PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v.59, n.8, p.1827-1837, 2003.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; STEVENSON, J.S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.3306–21, 2004.

FORAR, A.L.; GAY, J.M.; HANCOCK, D.D. The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v.43, p.989-1000, 1995.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.; CHEBEL, R.C.; RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.; BICALHO, R.C. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.:4240–52, 2007.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; JANZEN, E.; MCCARTNEY, D.H.; MAPLETOFT, R.J. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. **Can. Vet. J.**, v.41, p.786–90, 2000.

MUNRO, R.K.; MOORE, N.W. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. *J. Reprod. Fertil.*, v.73, p.353–9, 1985.

NISWENDER, G.D.; FARIN, C.E.; GAMBONI, R.; SAWYER, H.R.; NETT, T.M. Role of luteinizing hormone in regulating luteal function in ruminants. **J. Anim. Sci.**, v.63, Suppl. 2, p.1–13, 1986.

ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v.122, p.965–979, 2001.

SÁ FILHO, M.F.; MARQUES, M.O.; GIROTTO, R.; SANTOS, F.A.; SALA, R.V.; BARBUIO, J.P.; BARUSELLI, P.S. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v.81, p.284–290, 2014.

SCHMITT, E.J.P.; DIAZ, T.; BARROS, C.M.; DE LA SOTA, R.L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E.W.; STAPLES, C.R.; THORNER, R.; THATCHER, W.W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.1074–83, 1996.

STEVENSON, J.S.; CARTMILL, J.A.; HENSLEY, B.A.; EL-ZARKOUNY, S.Z. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by

ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v.60, p.475–83, 2003.

STEVENSON, J.S.; PORTALUPPI, M.A.; TENHOUSE, D.E.; LLOYD, A.; EBORN, D.R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J.M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.:331–40, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente dissertação foram apresentados dois artigos com os resultados da aplicação de benzoato de estradiol e hCG em protocolos de ressincronização da ovulação 24 dias após a IATF sobre a área do corpo lúteo, a produção de progesterona, taxas de prenhez (primeira IATF, segunda IATF e prenhez acumulada) e perdas gestacionais em novilhas de corte.

Os resultados obtidos demonstraram que a manipulação hormonal realizada no 24º dia após a primeira IATF não afetou negativamente as características luteais avaliadas (área do corpo lúteo e produção de progesterona). Novilhas tratadas com estradiol apresentaram resultados semelhantes às novilhas não ressincronizadas (grupo controle) ($P < 0,05$), ao passo que o tratamento com hCG determinou o aumento da área do corpo lúteo (hCG = 3,42 cm²; BE = 2,44 cm²; Controle = 2,61 cm²) e da concentração sérica de progesterona (hCG = 12,43 ng/mL; BE = 6,92 ng/mL; Controle = 7,29 ng/mL). Estes achados corroboram com as considerações descritas na literatura, nas quais referem que o efeito luteolítico do estradiol provavelmente esteja relacionado ao período de reconhecimento materno da gestação, quando há presença de receptores de estrógenos no endométrio, favorecendo a indução da luteólise; e que o hCG possui potente efeito luteotrófico favorecendo o desenvolvimento das células luteais produtoras de progesterona.

O desempenho reprodutivo da primeira IATF e as perdas gestacionais diagnosticadas no intervalo entre os exames ultrassonográficos, ratificam a hipótese de que a manipulação hormonal no 24º dia não implica na diminuição da prenhez que precede a ressincronização. As médias das taxas de prenhez na primeira IATF, somente nas novilhas ressincronizadas, foram: 55,7% (209/375) no Experimento 1 e 64,1% (118/184) no Experimento 2; estando estes resultados dentro da variação de 40 a 60% de prenhez em programas convencionais de IATF. A perda gestacional total de 7,6%, diagnosticada entre os dias 31 e 63 após a primeira IATF, também é considerada aceitável por estar dentro da média de 3 a 15% referidas em trabalhos realizados anteriormente.

Em contrapartida, as taxas de prenhez resultantes da segunda IATF não alcançaram índices esperados. Novilhas tratadas com benzoato de estradiol

apresentaram 40,0% de prenhez, resultado considerado baixo em relação à média da literatura (50%). Apesar de haver referências sobre a capacidade do hCG sincronizar a onda folicular, o tratamento com este hormônio resultou em menor taxa de prenhez, 22,2%. Analisando os resultados da segunda IATF observa-se que devido ao limitado número de animais, a pequena diferença numérica de novilhas gestantes resultou em 17,8 pontos percentuais de diferença na taxa de prenhez entre os grupos BE e hCG (sem diferença estatística). Este fato deve ser considerado na análise dos dados e na determinação da capacidade dos hormônios na ressincronização da onda folicular propriamente dita. Entretanto, conforme observado nos trabalhos publicados na literatura, há ainda uma variação na taxa de prenhez dos protocolos de ressincronização. Pressupõe-se que os animais que não concebem na primeira IATF, tenham uma resposta inadequada aos protocolos hormonais para sincronização de uma nova onda folicular. Para melhor compreensão desta hipótese estudos sobre a dinâmica folicular durante a ressincronização devem ser realizados.

Um dos principais benefícios dos programas de ressincronização da ovulação está relacionado à taxa de prenhez acumulada em um curto intervalo de tempo. No presente trabalho, após dois programas de IATF, em um intervalo de 33 dias, 70% dos animais já haviam concebido. Este fato reflete os relatos da literatura que descrevem os seguintes benefícios a partir da ressincronização da ovulação iniciada antes do diagnóstico de gestação precoce (28 a 32 dias de idade gestacional):

- Aumento da taxa de prenhez acumulada em um curto intervalo de tempo (32 ± 2 dias);
- Concentração dos períodos de acasalamento (2 a 3 protocolos de IATF, em no mínimo 30 a 60 dias);
- Aumento da taxa de serviço (IA de 100% do lote);
- Diminuição do intervalo parto-concepção (por antecipação e determinação do momento do serviço);
- Aumento do número de terneiros nascidos provenientes de IA, refletindo em aumento ganho genético do rebanho (um lote de 100 animais, aproximadamente 75 terneiros serão filhos de touros geneticamente superiores);
- Concentração da estação de parição (reflexo da concentração do período de acasalamento).

Portanto, para a execução de programas de ressincronização da ovulação se faz necessário à compreensão de todos os aspectos que podem interferir na resposta do rebanho frente a estes tratamentos, evitando frustrações e conclusões equivocadas sobre o uso da tecnologia. Conforme as observações realizadas durante a execução do presente trabalho e as informações da literatura, constituem-se de requisitos básicos para a execução de programas de ressincronização da ovulação para IATF: capacidade técnica para execução do diagnóstico de gestação precoce por ultrassom; controle do ciclo estral e dos tratamentos hormonais disponíveis; mão-de-obra qualificada para realização dos tratamentos hormonais; conhecimento da ciclicidade do rebanho manejado; condição nutricional e sanitária adequada para que os animais tenham peso mínimo crítico e condição corporal no início do programa; o entendimento sistêmico de uma propriedade rural para avaliar a capacidade de execução de programas intensificados de IATF.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; EVANS A.C.O.; RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotropins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.27-33, 1992.
- ANUALPEC 2013. **Anuário da Pecuária Brasileira**. AgraFNP, São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2013.
- AONO, F.H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A.A.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, v.79, p.242–8, 2013.
- ARAÚJO,V.R.; ALMEIDA, A.P.; MAGALHÃES, D.M.; MATOS, M.H.T.; TAVARES, L.M.T.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel das Proteínas Morfogenéticas Ósseas-6 e -7 (BMP-6 e -7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.69-78, 2010.
- AROSH, J.A.; BANU, S.K.; CHAPDELAINÉ, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v.145, p.2551–2560, 2004.
- ASBIA. INDEX ASBIA – Mercado de sêmen 2014. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf> Acesso em 02 de fev. 2016.
- BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: **2º Simpósio de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina-PR. Anais, p. 113-132, 2006.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular-fluid factors during development of follicle dominance. **Biol. Reprod.**, v.66, p.120–126, 2002.
- BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BJÖRKMAN, N. Placentation. In: Ullmann, H.D.; Brown, E.M. (Ed.). Textbook of veterinary histology. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1976. p.351-369.
- BRAY, A.R.; HECKER, J.F. Role of progesterone in regulating the length of the oestrous cycle in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.46, p.522–523, 1976.
- BURATINI, J.; GLAPINSKI, V.F.; GIOMETTI, I.C.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B.; AVELLAR, M.C.W.; BARROS, C.M.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth

factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4c, in fetal bovine preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.255-261, 2005.

BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GASSER, C.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v.60, p.647–658, 2003.

BURNS, M.G.; BUTTREY, B.S.; DOBBINS, C.A.; MARTEL, C.A.; OLSON, K.C.; LAMB, G.C.; STEVENSON, J.S. Evaluation of hCG as a replacement for GnRH in ovulation-synchronization protocols before fixed time AI in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.86, p.2539–2548, 2008.

BUTTREY, B.S.; BURNS, M.G.; STEVENSON, J.S. Ovulation and pregnancy outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v.73, p.449–459, 2010.

CAMPOS, J.T.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.80, p.619–623, 2013.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; SMART, V.M.; RYAN, M.; MACMILLAN, K.L. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device for 7 or 8d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24h after removal. **Theriogenology**, v.67, p.824–34, 2007.

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N.; JUCHEM, S.O.; THATCHER, W.W. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.60, p.1389–99, 2003.

CHEN, Y.; GREEN, J.A.; ANTONIOU, E.; EALY, A.D.; MATHIALAGAN, N.; WALKER, A.M.; AVALLE, M.P.; ROSENFELD, C.S.; HEARNE, L.B.; ROBERTS R.M. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. **Endocrinology**, v.147, n.5, p.2127-2137, 2006.

CHENAULT, J.R.; MCALLISTER, J.F.; KASSON, C.W. Synchronization of estrus with melengestrol acetate and prostaglandin F_{2α} in beef and dairy heifers. **J. Anim. Sci.**, v:68, p.296–303, 1990.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAINAR-JAIME, R.C.; GAVAGA, Q.A.; WHITTAKER, P.R.; SMALL, J.A.; MARTINEZ, M.F.; WILDE, R.E.; VEIRA, D.M.; MAPLETOFT, R.J. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. **Theriogenology**, v.65, p.557–72, 2006.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A.; WILDE, R.E.; WARD, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **Can. Vet. J.**, v.48, p.49–56, 2007.

Committee on Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. **Cornell Vet.**, v.62, p.216-237, 1972.

CUTAIA, L.; TRIBULO, R.; TEGLI, J.; MORENO, D.; BÓ, G.A. The use of estradiol and progesterone inserts during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. **Theriogenology**, v.57, p.373, 2002. (Abstr.).

DAHLEN, C.R.; LAMB, G.C. Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on ovarian structure dynamics and concentrations of progesterone in cycling Holstein heifers. **J. Anim. Sci.**, v86(E-Suppl. 2), p.249., 2008. (Abstr.)

DAHLEN, C.R.; MARQUEZINI, G.H.L.; LARSON, J.E.; LAMB, G.C. Human chorionic gonadotropin influences ovarian function and concentrations of progesterone in prepubertal Angus heifers. **J. Anim. Sci.**, v.89, p.2739-2749, 2011.

DANET-DESNOYERS, C.; WETZELS, C.; THATCHER, W.W. Natural and recombinant bovine interferon-tau regulata basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 α and E2 by epithelial and stromal cells in the endometrium. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, p.93-202, 1994.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, v.59, p.463-468, 1980.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; CARTMILL, J.A.; RICHARDSON, A.M.; MEDINA-BRITOS, M.A.; HENSLEY, B.A.; STEVENSON, J.S. Presynchronization of estrous cycles in lactating dairy cows with Ovsynch + CIDR and resynchronization of repeat estrus using the CIDR. **J. Dairy Sci.**, v.84(Suppl. 1), p.249., 2001. (Abstr.)

EL-ZARKOUNY, S.Z.; STEVENSON, J.S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.3306–3321, 2004.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, n.3, p.800-805, 1966.

FARIN, C.E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R.M. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. **Mol. Endocrinol.**, v.3, n.7, p.1099-1107, 1989.

FARIN, C.E.; IMAKAWA, K.; HANSEN, T.R.; MCDONNELL, J.J.; MURPHY, C.N.; FARIN, P.W.; ROBERTS R.M. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biol. Reprod.**, v.43, n.2, p.210-218, 1990.

FITZ, T.A.; MAYAN, M.H.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.27, p.703-711, 1982.

FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. **Nature**, v.297, n.5867, p.587-588, 1982.

FLINT, A.P.F.; SHELDRIK, E.L. Continuous infusion of oxytocin prevents induction of uterine oxytocin receptor and blocks luteal regression in cyclic ewes. **J. Reprod. Fertil.** v.75, p.623-631, 1985.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

FRICKE, P.M.; CARAVIELLO, D.Z.; WEIGEL, K.A.; WELLE, M.L. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation on three intervals following first timed insemination. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.3941-3950, 2003.

FUCHS, A.R.; BEHRENS, O.; HELMER, H.; LIU, C.H.; BARROS, C.M.; FIELDS, L.J. Oxytocin and vasopressin receptor in bovine endometrium and myometrium during the oestrous -cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v.127, p.629-636, 1990.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.; CHEBEL, R.C.; RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.; BICALHO, R.C. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.4240-52, 2007.

GEARY, T.W.; SALVERSON, R.R.; WHITTIER, J.C. Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows. **J. Anim. Sci.** v.79, p.2536-2541, 2001.

GINTHER, O.J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **J. Anim. Sci.**, v.39, n.3, p.550-564, 1974.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOFF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v.32, n.5, p.787-795, 1989a.

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

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, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, v.62, p.920–927, 2000.

GIORDANO, J.O.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. Humoral immune response in lactating dairy cows after repeated exposure to human chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v.78, p.218–224, 2012.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol. Reprod.**, v.55, p.68-74, 1996.

GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v.124, n.2, p.289-300, 2002.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproductive Cycles. **In:_____**. Reproduction in Farm Animals. 7ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reprodução Animal, 7ª ed. Barueri, São Paulo, Ed.Manole, 2004.

HAYASHI, K.; ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; KOBAYASHI, S.; OHTANI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, v.70, n.3-4, p.339-349, 2003.

HIXON, J.; FLINT, A.P.F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2a secretion in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.457–467, 1987.

HORN, S.; BATHGATE, R.; LIOUTAS, C.; BRACKEN, K.; IVELL, R. Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. **Hum. Reprod. Update**, v.4, p.605-614, 1998.

IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers:changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**, v.112, p.150–156, 1983.

JENNER, L.J.; PARKINSON, T.J.; LAMMING, G.E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.91, p.49-58, 1991.

KENNY, N.; FARIN, C.E.; NISWENDER, G.D. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. **Biol. Reprod.**, v.40, n.1, p.191-196, 1989.

LAMMING, G.E.; MANN, G.E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 α production in cows by progesterone and oestradiol. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.69–73, 1995.

LAMMING, G.E.; WHATES, D.C.; FLINT, A.P.F.; PAYNE, J.H.; STEVENSON, K.R.; VALLET, J.L. Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. **J. Reprod. Fertil.**, v.105, p.165-175, 1995.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v.245, p.57-60, 1994.

LEUNG, S.T.; CHENG, Z.; SHEKDRICK, E.L.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.F.; WHATES, D.C. The effects of lipopolysaccharide and interleukins -1 α -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. **J. Endocrinol.**, v.168, p.497-508, 2001.

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

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, n.2, p.301-307, 1987.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.; BARBOSA, R.T.; DE OLIVEIRA, C.A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v.69, p.798–804, 2008.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproductive Science**, v.42, p.307-320, 1996.

MACMILLAN, K.L.; TAUFA, V.K.; DAY, A.M. Manipulating ovaries' follicle wave pattern can partially synchronise returns to service and increases the pregnancy rate to second insemination. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v.57, p.237., 1997. (Abstr.).

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAÚJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.171-182, 2009.

MANN, G.E.; PAYNE, J.H.; LAMMING, G.E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F2 α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. **Domest Anim Endocrinol**, v.21, p.127–141, 2001.

MANN, G.E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.296-299, 2009.

MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; BO, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in *Bos taurus* × *Bos indicus* heifers administered different treatments on day 7 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.57, p.548, 2002.

MARQUES, M.O.; RIBEIRO JÚNIOR, M.; SILVA, R.C.; SÁ FILHO, M.F.; VIEIRA, L.M.; BARUSELLI, O.S. Resynchronization in beef cattle. **In:** Fifth International Symposium of Applied Animal Reproduction 2012. Londrina: SIRAA; 2012. p. 82–92.

MCCRACKEN, J.A.; BAIRD, D.T.; CARLSON, J.C.; GODING, J.R.; BARCIKOWSKI, B. The role of prostaglandins in luteal regression. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl, v.18, p.133-42, 1973.

MCCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: A Neuroendocrine Mediated Event. **Physiological Reviews**, v.79, n.2, April, 1999.

MEYER, H.D.D.; MITTERMEIER, T.H.; SCHAMS, D. Dynamics of oxytocin, estrogen and progesterin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. **Acta Endocrinol**, (Copenh), v.118, p.96–104, 1988.

MUNRO, R.K.; MOORE, N.W. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. **J. Reprod. Fertil.**, v.3, p.353–9, 1985.

NASCIMENTO, A.B.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; COSTA, F.P.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Effects of treatment with human chorionic gonadotropin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentration in lactating dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, n.5, p.818-824, 2012.

NISWENDER, G.D.; SCHWALL, R.H.; FITZ, T.A.; FARIN, C.E.; SAWYER, H.R. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.41, p.101–151, 1985.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYNSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews, Baltimore**, v.80, p.1-28, 2000.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L. et al. Eficiência reprodutiva em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta. *Anais... XVI Reunião do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 2005.

PHILLIPS, D.J.; DE KRETZER, D.M. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. **Neuroendocrinol.** v.19, p.287–322, 1998.

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

- PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.301-306, 1997.
- RAJAKOSK, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v.34, p.7-68, 1960.
- RHINEHART, J.D.; STARBUCK-CLEMMER, M.J.; FLORES, J.A.; MILVAE, R.A.; YAO, J.; POOLE, D.H.; INSKEEP, E.K. Low peripheral progesterone and late embryonic/ early fetal loss in suckled beef and lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.71, p.480–90, 2009.
- RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L.; DAJEE, M.; ALLISTON, T.N. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Mol. Cell. Endocrinol**, v.145, p.47–54, 1998.
- ROBERTS, R.M. A role for interferons in early pregnancy. **Bioessays**, v.13, n.3, p.121-126, 1991.
- ROBERTS, R.M.; CROSS, J.C.; LEAMAN, D.W. Unique features of the trophoblast interferons. **Pharmacol. Ther.**, v.51, n.3, p.329-345 1991.
- ROBERTS, R.M.; LIU, L.; ALEXENKO, A. New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships. **Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.**, v.56, p.287-325, 1997.
- ROBERTS, R.M.; CHEN, Y.; EZASHI, T.; WALKER, A.M. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. **Semin Cell Dev. Biol.**, v.19, n.2, p.170- 177, 2008.
- ROBINSON, N.A.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.202–207, 1989.
- ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; WHATES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v.122, p.965-979, 2001.
- ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, p.19-27, 1996.
- SÁ FILHO, M.F.; MARQUES, M.O.; GIROTTO, R.; SANTOS, F.A.; SALA, R.V.; BARBUIO, J.P.; BARUSELLI, P.S. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v.81, p.284–290, 2014.

SANTOS, J.E.P.; 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, p.2881-2894, 2001.

SANTOS, J.E.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.; GALVA, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim. Reprod. Sci.** v.82, p.83:513–535, 2004.

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SARTORI, R.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lacting cows in summer and lacting and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 5, p.2813-2822, 2002.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, n.2, p.663-671, 1988.

SCHMITT, E.J.P.; DIAZ, T.; BARROS, C.M.; DE LA SOTA, R.L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E.W.; STAPLES, C.R.; THORNER, R.; THATCHER, W.W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.1074–83, 1996.

SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, K.G.; NAGAI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F₂alpha during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.76, n.6, p.965-970, 2007.

SILCOX, R.W.; POWELL, K.L.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and prostaglandin. **Theriogenology**, v.43, p.325 (Abstr.). 1995.

SILVIA, W.J.; LEWIS, G.S.; MCCRACKEN, J.A.; THATCHER, W.W.; WILSON, J.R. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂alpha during luteolysis in ruminants. **Biol. Reprod.**, v.45, p.655–663, 1991.

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

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-317, 1988.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.2, p.49, 2004.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biol. Reprod.**, v.53, p.1527-1543, 1995.

SPENCER, T.E.; BECKER, W.C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M.A.; OGLE, T.F.; BAZER, F.W. Ovine interferon- τ inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v.136, p.4932-4944, 1995.

SPENCER, T.E.; MIRANDO, M.A.; MAYES, J.S.; WATSON, G.H.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Effects of interferon-tau and progesterone on oestrogen-stimulated expression of receptors for oestrogen, progesterone and oxytocin in the endometrium of ovariectomized ewes. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p.843-853, 1996.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v.137, n.3, p.1144-1147, 1996.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth Factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v.54, p.255-263, 1996.

STERRY, R.A.; WELLE, M.L.; FRICKE, P.M. Effect of interval from timed artificial insemination to initiation of resynchronization of ovulation on fertility of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.2099-109, 2006.

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

STEVENSON, J.S.; CARTMILL, J.A.; HENSLEY, B.A.; EL-ZARKOUNY, S.Z. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v.60, p.475-83, 2003a.

STEVENSON, J.S.; JOHNSON, S.K.; MEDINA-BRITOS, M.A.; RICHARDSON-ADAMS, A.M.; LAMB, G.C. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.1681-1692, 2003b.

STEVENSON, J.S.; LAMB, G.C.; JOHNSON, S.K.; MEDINA-BRITOS, M.A.; GRIEGER, D.M.; HARMONEY, K.R.; CARTMILL, J.A.; EL-ZARKOUNY, S.Z.; DAHLEN, C.R.; MARPLE, T.J. Supplemental norgestomet, progesterone, and MGA increases pregnancy rates in suckled beef cows after timed inseminations. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.571–586, 2003c.

STEVENSON, J.S.; PORTALUPPI, M.A.; TENHOUSE, D.E.; LLOYD, A.; EBORN, D.R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J.M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **J. Dairy. Sci.**, v.90, p.331–40, 2007.

STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; INSKEEP, E.K. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. **J. Dairy Sci.**, v.91, p.3092–101, 2008.

SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; DIAZ, F.J.; PANGAS, S.A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M.J.; MATZUK, M.M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J.J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v.134, p.2593-2603, 2007.

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.3, p.547-555, 1994.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus non pregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.115-123, 1991.

THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T.R.; PRU, J.K. Uterine conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1435-1450, 2001.

VALLET, J.L.; LAMMING, G.E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. **J. Reprod. Fertil.**, n.90, p.625–634, 1990.

VAN CLEEFF, J.; MACMILLAN, K.L.; DROST, M.; LUCY, M.C.; THATCHER, W.W. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. **Theriogenology**, v.46, p.1117–1130, 1996.

WATHES, D.C.; HAMON, M. Localization of oestradiol, P4 and oxytocin receptors in the uterus during the oestrus cycle and early pregnancy of the ewe. **J. Endocrinol.**, v.138, p.479–491, 1993.

WATHES, D.C.; LAMMING, G.E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.49, p.53-67, 1995.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J-G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.**, v.82,E63-74, 2004.

WILMUT, I.; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.851-864, 1986.

XIAO, C.; LIU, W.J.; SIROIS, J.; GOFF, A.K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in bovine epithelial cells. **Endocrinology**, v.139, p.2293-2299, 1998.

XIAO, C.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v.115, p.101-109, 1999.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-957, 1995.

YUNG, M.C.; VANDEHAAR, M.J.; FOGWELL, R.L.; SHARMA, B.K. Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum progesterone and on weight of corpus luteum in heifers. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2239-2244, 1996.