

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**RESTABELECIMENTO DA ATIVIDADE OVARIANA EM VACAS NELORE**  
**(*Bos taurus indicus*) TRATADAS COM IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE**  
**AGONISTA DE GnRH (DESLORELINA) DURANTE 70 DIAS**

**FLAVIA CAROLINE DESTRO**

BOTUCATU, SP

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**RESTABELECIMENTO DA ATIVIDADE OVARIANA EM VACAS NELORE**  
**(*Bos taurus indicus*) TRATADAS COM IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE**  
**AGONISTA DE GnRH (DESLORELINA) DURANTE 70 DIAS.**

**FLAVIA CAROLINE DESTRO**

Dissertação apresentada junto ao programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira**

BOTUCATU, SP

2012

Nome do autor: Flavia Caroline Destro

Título: Restabelecimento da atividade ovariana em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)  
tratadas com implante subcutâneo de agonista de GnRH (deslorelina) durante 70 dias

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lindsay Unno Gimenes

Membro

Centro Universitário Anhanguera

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba

Membro

FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 25 de julho de 2012

*“Senhor, creio que vale a pena estudar!  
Estudando, os dons que me deste hão-de render mais,  
e assim poderei servir melhor.  
Estudando, estou a santificar-me.  
Senhor, que o estudo forje em mim ideais grandes!  
Aceita, Senhor, a minha liberdade, a minha memória,  
a minha inteligência e a minha vontade.  
De Ti, Senhor, recebi estas capacidades para estudar. Ponho-as em Tuas  
mãos.  
Tudo é Teu. Que tudo se faça segundo a Tua vontade! Senhor, que eu seja  
livre!  
Ajuda-me a ser disciplinado, interior e exteriormente. Senhor, que eu seja  
verdadeiro!  
Que as minhas palavras, ações e silêncios,  
nunca levem os outros a pensar que sou aquilo que não sou.  
Livra-me Senhor, de cair na tentação de copiar.  
Senhor, que eu seja alegre!  
Ensina-me a cultivar o sentido de humor  
e a descobrir e a testemunhar as razões da verdadeira alegria.  
Dá-me, Senhor, a felicidade de ter amigos  
e de sabê-los respeitar através das minhas conversas e atitudes.  
Deus Pai que me criaste:  
ensina-me a fazer da minha vida uma verdadeira obra prima!  
Divino Jesus:  
imprime em mim as marcas da Tua Humanidade!  
Divino Espírito Santo:  
ilumina as trevas da minha ignorância;  
vence a minha preguiça;  
põe na minha boca a palavra certa!”*

*São Tomás de Aquino*

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Wilson Destro** (*in memoriam*), por ser meu anjo da guarda. SAUDADES!

A minha mãe **Lourdes Antonia de Moraes Destro**, pelo apoio em todos os momentos de minha vida e principalmente nesta fase.

*Não há palavras que expressem minha eterna gratidão e meu amor a vocês!*

*Assim dedico...*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e conhecer todas as pessoas que citarei abaixo.

A minha mãe **Lourdes**, por dedicar a sua vida exclusivamente a seus dois filhos. A meu irmão **Fabiano** e minha cunhada **Juliana**, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando nos momentos bons e ruins da vida. Aos meus amados **tios (as)** e **primos (as)** pelo enorme carinho e atenção sempre.

Aos meus **queridos animais de estimação**, Heros, Patrícia, Chilica, Zequinha, Lili, Boehmia, Memel, Chico, Betinho, Jorginho e Hanna, pela alegria imensa que sempre me proporcionaram. Foram e serão muito mais que amigos!

À minha querida prima-irmã-amiga **Elis**, pela ternura, conselhos e eterna parceria. Às minhas amigas de infância e para toda a vida, **Jhoanne Hansen, Fernanda G. Marciano, Angela Silva e Viviane Martim**, o tempo e a distância só fortaleceram o carinho que tenho por vocês.

À família que Deus me concedeu durante a graduação, e que tenho imensa gratidão e carinho **Vanessa Covre, Daniele Basseto, Maiara Destro, Iassudara Garcia, Daniele Pereira, Marina Pegorer, Carolina Moraes, Angélica Rodrigues e Carla Queiroz**, as três últimas eu tenho a alegria de estarem mais perto de mim durante o Mestrado. Obrigada por tudo!

Aos **grandes amigos (as)** conquistados durante a universidade e todos da **XI Turma de Medicina Veterinária-UENP/CLM**. Estarão para sempre em meu coração!

A todos meus **Professores**, mestres e amigos da **UENP-CLM**, em especial Prof. Dr. **Thales Ricardo Rigo Barreiros** e Prof. Dr. **Marcelo Alves**, minha eterna gratidão.

Ao meu orientador **Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira**, pela oportunidade, paciência e apoio. A todos os professores durante o curso de Mestrado, pelos sábios ensinamentos, em especial a **Prof. Eunice Oba, Fernanda Landim, Denise Lopes, Frederico O. Papa, Sony D. Bicudo, Nereu C. Prestes, Cezinande Meira e Marco Alvarenga**.

A todos os colegas que compuseram e compõem a equipe de pesquisa coordenada pelo Professor João, entre eles **Mariana Curci, Eduardo Trevisol, Cinthia**

**Rio Branco, Érika Fruhvald, Carla Queiroz, Carolina Fujihara, Camila Luba** e em especial ao **Wolff Camargo Marques Filho**.

Aos colegas pós-graduandos, em especial a alguns que se tornaram **bons amigos, Rosiara Maziero, Leandro Maia, Jair Camargo e Camila Ackerman**. Obrigada pela parceria que construímos.

A todos os **animais experimentais**, por contribuírem para novos conhecimentos na área. Aos **funcionários** da instituição, que ajudaram diretamente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às Profs.(a) Drs. (a) **Eunice Oba e Lindsay Unno Gimenes** por participarem da banca como membros titulares. E aos Profs. Drs. **Sony Dimas Bicudo e Thales Ricardo Rigo Barreiros** por participarem como membros suplentes.

A Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/BOTUCATU, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Peptech Animal Health pela concessão dos implantes subcutâneos da deslorelina (Suprelorin®).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento e formação pessoal, intelectual e profissional e que, por falha de minha memória, não tenham sido mencionados.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Pág</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabela 1.</b> Nomes comerciais, formulação, via de administração e potência relativa de alguns agonistas do GnRH.....                                                                                                                                                                                     | 13         |
| <b>Tabela 2.</b> Concentração plasmática de progesterona média± desvio padrão, máxima e mínima (ng/mL) de vacas Nelore ( <i>Bos indicus</i> ) durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com _____ agonista _____ de GnRH (deslorelina Suprelorin <sup>®</sup> 4,7mg)..... | 27         |
| <b>Tabela 3.</b> Concentração plasmática de FSH e LH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) durante o período de tratamento de 70 dias com o agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin <sup>®</sup> ).....                                                                                                             | 31         |
| <b>Tabela 4.</b> Intervalo entre o dia da retirada do implante do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin <sup>®</sup> 4,7 mg), a ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório em vacas Nelore ( <i>Bos indicus</i> ).....                                                                              | 33         |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Pág</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figura 1 -</b> Sequência do aminoácido de GnRH e do acetato de deslorelina em mamíferos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 15         |
| <b>Figura 2 -</b> Protocolo de sincronização da ovulação de vacas Nelore ( <i>Bos indicus</i> ). BE (Estrogin <sup>®</sup> , Farmavet Ltda, Brasil); P <sub>4</sub> (DIB <sup>®</sup> , Intervet Schering-Plough, Brasil); PGF <sub>2α</sub> (Dinoprost trometamina, Lutalyse <sup>®</sup> , Pfizer Saúde Animal, Brasil); D10 e D11: exame ultrassonográfico transretal a cada 12 horas para determinação da ovulação..... | 21         |
| <b>Figura 3 -</b> Aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin <sup>®</sup> 4,7mg) nos animais experimentais.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 22         |
| <b>Figura 4 -</b> Implante subcutâneo não degradável de 4,7 mg do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin <sup>®</sup> , Peptech Animal Health, North Ride, Austrália) removido após 70 dias de tratamento.....                                                                                                                                                                                                            | 26         |
| <b>Figura 5-</b> Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n <sup>o</sup> 1 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin <sup>®</sup> 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório) .....                                     | 28         |
| <b>Figura 6 -</b> Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n <sup>o</sup> 2 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin <sup>®</sup> 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira                                                                                                            |            |

ovulação (ov = ovulação;  $\emptyset$  = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).....29

**Figura 7 -** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n° 4 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação;  $\emptyset$  = Diâmetro do folículo pré-ovulatório)..... 29

**Figura 8 -** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n° 6 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação;  $\emptyset$  = Diâmetro do folículo pré-ovulatório) ..... 29

**Figura 9 -** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n°3 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação;  $\emptyset$  = Diâmetro do folículo pré-ovulatório)..... 30

**Figura 10 -** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore n° 5 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação;  $\emptyset$  = Diâmetro do folículo pré-ovulatório)..... 30

- Figura 11** - Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 7 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação..... 31
- Figura 12** - Número médio de folículos < 0,4 cm, 0,4-0,6 cm e > 0,6 cm em vacas Nelore (*Bos indicus*) durante os vinte dias que antecederam a remoção do implante subcutâneo do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. \* indicam diferença significativa entre os D-20 e D-16 ( $p < 0,05$ )..... 32
- Figura 13** - Número médio de folículos < 0,4 cm, 0,4-0,6 cm e > 0,6 cm em vacas Nelore (*Bos indicus*) após a remoção do implante subcutâneo do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin®). \* indicam diferença significativa entre os D-21 e D-3 ( $p < 0,05$ )..... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C** = grau celsius

**µg** = micrograma

**AMPc** = adenosina monofosfato ciclico

**ATP** = adenosina tri-fosfato

**BE** = benzoato de estradiol

**bST** = somatotropina bovina

**CL** = corpo lúteo

**Cm** = centímetros

**COX-2** = Ciclooxigenase dois

**E<sub>2</sub>** = estradiol

**ECC** = escore de condição corporal

**FGF** = fator de crescimento fibroblástico

**FD** = Folículo dominante

**FSH** = hormônio folículo estimulante

**FSHR** = receptor do hormônio folículo estimulante

**GnIH** = hormônio inibidor das gonadotrofinas

**GnRH** = hormônio liberador de gonadotrofinas

**GnRHa** = agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas

**GnRHR** = receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas

**IGF** = fator de crescimento semelhante a insulina

**IGF-I** = fator de crescimento semelhante a insulina tipo I

**IGFBP** = proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina

**i.m** = intramuscular

**LH** = hormônio luteinizante

**LHR** = receptor do hormônio luteinizante

**mg** = miligrama

**mL** = mililitros

**mm** = milímetros

**mRNA** = RNA mensageiro

**ng** = nanograma

**OV** = ovulação

**P<sub>4</sub>** = progesterona

**PGE<sub>2</sub>** = prostaglandina E<sub>2</sub>

**PGF<sub>2</sub> $\alpha$**  = prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

**RFRP** = RFamíde relacionados

**RT-PCR** = transcriptase reversa da reação em cadeia de polimerase

**US** = ultrassom

## SUMÁRIO

|                                                        |             |
|--------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                     | <b>xv</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                   | <b>xvii</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                              | <b>2</b>    |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                   | <b>4</b>    |
| 2.1 Fisiologia do ciclo estral em bovinos.....         | 5           |
| 2.2 Dinâmica folicular ovariana .....                  | 6           |
| 2.2.1 Foliculogênese .....                             | 6           |
| 2.2.2 Crescimento folicular em padrão de ondas .....   | 6           |
| 2.2.3 Emergência da onda folicular .....               | 7           |
| 2.2.4 Desvio ou divergência folicular .....            | 8           |
| 2.2.5 Seleção do folículo dominante (FD) .....         | 9           |
| 2.2.6 Luteólise e ovulação .....                       | 11          |
| 2.3 Hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) ..... | 12          |
| 2.4 Agonistas de GnRH (GnRHa) .....                    | 13          |
| 2.4.1 Acetato de deslorelina .....                     | 14          |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                | <b>18</b>   |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                       | <b>20</b>   |
| 4.1 Animais experimentais e instalações .....          | 21          |
| 4.2 Sincronização da ovulação.....                     | 21          |
| 4.3 Tratamento com deslorelina.....                    | 21          |

|                                         |           |
|-----------------------------------------|-----------|
| 4.4 Avaliações ultrassonográficas ..... | 23        |
| 4.5 Dosagem hormonal .....              | 23        |
| 4.6 Análise estatística .....           | 24        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                | <b>25</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>                 | <b>35</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES.....</b>                | <b>41</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                | <b>43</b> |
| <b>TRABALHO CIENTÍFICO .....</b>        | <b>58</b> |

DESTRO, F. C. Restabelecimento da atividade ovariana em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com implante subcutâneo de agonista de GnRH (deslorelina) durante 70 dias. Botucatu, 2012. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

## RESUMO

Avaliar em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas por longo prazo (70 dias) com implantes subcutâneos de agonista de GnRH (deslorelina- -Suprelorin<sup>®</sup> 4,7 mg) a dinâmica folicular ovariana e as concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH), do hormônio luteinizante (LH) e da progesterona (P<sub>4</sub>) durante os últimos 20 dias do tratamento, e a dinâmica folicular ovariana e as concentrações de P<sub>4</sub> da remoção do implante até a ovulação. Quinze vacas Nelore com escore de condição corporal (ECC)  $\geq 3$  tiveram sua ovulação sincronizada. No dia da detecção da ovulação, 10 animais foram selecionados para serem submetidos ao tratamento com implante subcutâneo de deslorelina. Nos últimos 20 dias do período de tratamento, foram realizados exames ultrassonográficos, a cada 2-3 dias, para caracterização da dinâmica folicular e registro dos folículos, que foram classificados de acordo com o diâmetro como: I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6cm) e III (> 0,6cm). Neste mesmo período foram coletadas amostras de sangue para mensuração das concentrações plasmáticas de FSH, LH e P<sub>4</sub>. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram determinadas através do teste de Tukey. Durante os 70 dias de tratamento com a deslorelina nenhum animal ovulou, apesar de não ter sido observado a supressão do desenvolvimento folicular. Esse achado ultrassonográfico foi confirmado pelos resultados da concentração plasmática de P<sub>4</sub>, que se manteve em média abaixo de 0,16 ng/mL. Durante os últimos 20 dias de tratamento, quatro animais apresentaram desenvolvimento folicular com diâmetro máximo variando entre 0,4 a 0,6 cm, enquanto que nos três restantes foram observados diâmetros superiores a 0,9 a 1,2 cm. As secreções de FSH e LH não foram abolidas ao longo do estudo. Após a remoção do implante subcutâneo de deslorelina (Suprelorin<sup>®</sup> 4,7 mg), o período de restabelecimento da capacidade ovulatória foi de  $29,28 \pm 8,84$  dias e o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi de  $1,25 \pm 0,2$  cm. Durante esse período quatro vacas (4/7) apresentaram folículos que atingiam o diâmetro pré-ovulatório (> 0,8 cm) e em seguida regrediam, o

que era seguido pela emergência de novas ondas de crescimento folicular até que o desenvolvimento culminasse com a ovulação; outro padrão observado em três animais (3/7) caracterizou-se pelo desenvolvimento de folículos de diâmetros  $\leq 0,8$  cm, que regrediam e eram também seguidos pela emergência de novas ondas foliculares. As concentrações plasmáticas de  $P_4$  nesse período mantiveram-se baixas, não ultrapassando  $0,15 \pm 0,17$  ng/mL. Durante o período de recuperação foi observado o fenômeno da co-dominância folicular e a dupla ovulação em dois animais(2/7). A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento por 70 dias com implantes subcutâneos de deslorelina em vacas Nelore inibe a ovulação, sem deprimir completamente o desenvolvimento folicular. Após a remoção do implante os animais recuperaram a capacidade ovulatória em média em 29 dias.

Palavras-chave: Nelore, deslorelina, inibição da ovulação, dinâmica folicular, restabelecimento da atividade ovulatória.

DESTRO, F. C. Restoration of ovarian activity in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) treated with subcutaneous implants of GnRH agonist (deslorelin) during 70 days. Botucatu, 2012. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study was to evaluate in Nelore cows (*Bos indicus*) treated for a long period (70 days) with subcutaneous implants of deslorelin (GnRH agonist-Suprelorin<sup>®</sup> 4,7mg) the ovarian follicular dynamics and plasma concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and progesterone (P4) during the last 20 days of treatment and the ovarian follicular dynamics and plasma concentrations of P4 from the removal of the implant until the ovulation. Fifteen Nelore cows with body condition score (BCS)  $\geq 3$  had their ovulation synchronized. At the day of the detection of ovulation 10 animals were randomly selected to receive subcutaneous implant of deslorelin. In the last 20 days of the period of implantation, ultrasonographic scans were realized, every 2-3 days, in order to characterize the follicular dynamics and to register the follicles which were classified according to diameter as: I (< 0,4 cm), II (0,4-0,6cm) and III (> 0,6cm). Simultaneously, blood samples were collected to measure plasma concentrations of FSH, LH and P4. Results were tested by analysis of variance and difference between means were defined using Tukey's test. During the 70 days of deslorelin implantation none of the animals ovulated, despite of the implant not suppressing all follicular development. This ultrasonographic finding was confirmed by the results of P4 plasma concentrations, which was kept in average below 0,16 ng/mL. During the last 20 days of implantation, four animals presented follicular development with maximum diameter ranging through 0,4 to 0,6 cm while in the three remaining animals the observed diameter ranged through 0,9 to 1,2 cm. The secretion of LH and FSH was not entirely suppressed during the study. After the removal of the deslorelin subcutaneous implant (Suprelorin<sup>®</sup> 4,7 mg), the period of restoration of the ovulatory capacity was  $29,28 \pm 8,84$  days and the mean diameter of the pre-ovulatory follicle was  $1,25 \pm 0,2$  cm. During this period, four cows (4/7) presented follicles that attained pre-ovulatory diameter (> 0,8 cm) and then regressed, followed by the emergence of new follicular waves until the follicular

development reached the point of ovulation; another pattern observed in three animals (3/7) was characterized by the development of follicles with diameter  $\leq 0,8$  cm which regressed and were followed by the emergence of new follicular waves. P4 plasma concentrations during this time were low, not surpassing  $0,15 \pm 0,17$  ng/mL. During the recovery period, it was observed the phenomenon of follicular codominance and double ovulation in two animals (2/7). From the results obtained it can be conclusive that the treatment for 70 days with deslorelin subcutaneous implants in cows inhibits ovulation without depressing completely the follicular development. After removal of the implant the animals regained the ovulatory ability in a mean of 29 days.

Keywords: Nelore, deslorelin, ovulation inhibition, follicular dynamics, restoration of ovulatory activity.

## INTRODUÇÃO

## 1 Introdução

O Brasil apresenta o maior rebanho bovino comercial do mundo, composto por aproximadamente 209,5 milhões de animais, sendo também o primeiro colocado em animais livres de febre aftosa (SCOT CONSULTORIA, 2010; IBGE, 2011; USDA, 2012).

Cerca de 80% desses animais são constituídos por raças zebuínas (*Bos indicus*), animais de comprovada rusticidade e adaptação ao ambiente do nosso país. Dentre estas raças, podemos destacar a Nelore, que pode ser encontrada por toda extensão do território nacional, em grande maioria na região centro-oeste (IBGE 2011).

Em bovinos, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva, o que requer a obtenção de um bezerro/vaca/ano. Sendo o período médio de gestação do Nelore de 290 dias e, 30 dias o período mínimo necessário à involução uterina e restabelecimento dos estoques de LH na hipófise, observa-se que para se obter um intervalo entre partos de um ano é necessário que a vaca encontre-se prenhe num período de, no máximo, 45 dias (YAVAS e WALTON, 2000b; BARUSELLI et al., 2007).

Deste modo, o longo período de anestro e de restabelecimento da atividade ovariana pós-parto, e o baixo índice de fertilidade no primeiro ciclo estral subsequente são alguns dos fatores que limitam a produtividade e resultam em significativas perdas econômicas (BARUSELLI et al., 2004; SILVA, 2004; BARUSELLI et al., 2007).

Após o parto, há diminuição da concentração plasmática de  $P_4$ , que resulta no acúmulo de LH na hipófise anterior. A secreção de FSH aumenta rapidamente, suficiente para estimular o recrutamento folicular, enquanto que os pulsos de LH, necessário para o crescimento do folículo após a fase de desvio, imprescindíveis para que ocorra a ovulação, são retomados cerca de 20 a 30 dias após o parto (WILLIAMS, 2005).

Tratamentos por longos períodos com agonistas de GnRH, como a deslorelina, têm sido utilizados em machos e fêmeas para reduzir o intervalo entre partos de vacas de origem taurina, tratar cistos foliculares e controlar a atividade reprodutiva de várias espécies animais (D'OOCHIO et al., 1996; MATTOS et al., 2001; PADULA, 2005; SILVESTRE et al., 2009a, 2009b; GÜNGÖR et al., 2010).

O tratamento crônico em vacas implantadas com deslorelina, induz rapidamente a um estado de dessensibilização endógena e acarreta a indução de um estado de anestro (D'OCCHIO et al., 2000). Devido à grande capacidade em controlar o ciclo estral na espécie bovina, a deslorelina vem sendo foco de muitos estudos a fim de compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento folicular e ovulação nas demais espécies mamíferas, visto que esse fármaco apresenta efeitos pró e anti-fertilidade (PADULA e MACMILLAN, 2005).

## **REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 Fisiologia do ciclo estral em bovinos

O Ciclo estral compreende as modificações fisiológicas, endócrinas e morfológicas do aparelho reprodutor feminino que ocorrem entre dois episódios de estro consecutivos, tendo início na puberdade. A fêmea da espécie bovina é considerada poliéstrica anual, ou seja, apresenta ciclicidade ovariana, durante o ano inteiro (MIES FILHO, 1977; ANTONIOLLI, 2002).

A duração de cada ciclo estral em bovinos é de aproximadamente 21 dias, podendo variar entre 18 e 24 dias. A duração da manifestação de cio varia de 12 a 24 horas (MORAES et al., 2001) e a ovulação ocorre em torno de 24 a 30 horas após o início do estro (DROST, 1995) ou de 8 a 15 horas após o término do estro (MIES FILHO, 1977).

Segundo Drost (1995), o ciclo estral é dividido em quatro fases, estro (dia 0), metaestro (dia 1-4), diestro (dia 5-18) e proestro (dia 19 até o próximo estro). Há também outra classificação mais simplificada, que divide o ciclo estral em fase folicular ou estrogênica, que vai desde a regressão do corpo lúteo (CL) até a ovulação do folículo dominante (FD), sendo relativamente curta em vacas, com duração de 3 a 6 dias. E a fase luteínica ou também conhecida como progesterônica, que compreende o período de atividade do CL até a sua regressão, com duração de 16 a 17 dias em vacas (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo Hafez e Hafez (2004), o ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente por hormônios hipotalâmicos (GnRH), hipofisários (LH e - FSH) e gonadais (estradiol - E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> e inibina).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo e após ser liberado sob a forma de pulsos (CLARKE, 1988), atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, onde causa a liberação das gonadotrofinas FSH e LH. Essas gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e secreção dos estrógenos gonadais (STANISLAUS et al., 1998).

O FSH e o LH são liberados pelas células da adenohipófise, de acordo com a estimulação do GnRH e suas secreções são reguladas por meio de *feedback* positivo e negativo de acordo com a secreção e a concentração plasmática dos esteroides

gonadais; esses hormônios são denominados de gonadotrofinas por estimular a secreção hormonal dos ovários e dos testículos (SENGER, 2003).

A principal função do FSH na fêmea é promover a emergência e o crescimento inicial dos folículos, que são responsáveis pela produção de  $E_2$ . O pico de  $E_2$  é seguido pelo pico pré-ovulatório de LH, imprescindível a ovulação, que acarreta a formação do CL por meio da luteinização das células da granulosa e da teca (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

## **2.2 Dinâmica folicular ovariana**

### **2.2.1 Foliculogênese**

Em bovinos, a foliculogênese é um processo contínuo de crescimento e atresia folicular que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001). Porém, é interessante ressaltar que menos de 0,1% dos folículos se desenvolvem a partir da fase pré-antral até a ovulação (WEBB et al., 2007; MORAES et al., 2008).

Nos ovários de uma fêmea púbere podem ser encontrados folículos primordiais, que consistem de um oócito rodeado por uma camada de células somáticas achatadas; folículos primários, quando a única camada de células da granulosa ao redor do oócito torna-se cuboidal; folículos secundários ou pré-antrais, apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa desenvolvidas e o oócito entra numa fase de crescimento intensivo; folículos terciários ou antrais em maturação, caracterizados por uma cavidade repleta de fluído folicular, o antro, dentro da multicamada da granulosa, também denominado de folículo pré-ovulatório ou de *Graaf* (VAN DEN HURK e ZHAO, 2003).

### **2.2.2 Crescimento folicular em padrão de ondas**

O padrão de ondas foliculares, ocorre em todos os estágios de vida de uma fêmea, no período anterior a puberdade (ADAMS et al., 1992) durante a gestação (GINTHER et al., 1996) e no pós-parto (MURPHY et al., 1990).

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas, com apresentação de uma, duas ou três ondas de crescimento folicular (RHODES et al., 1995). Em zebuínos existe relato de maior incidência de três ondas, sendo notificada a

presença de até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (FIGUEIREDO et al., 1997).

Para o padrão de duas ondas, a primeira começa no dia 0 do ciclo estral, correspondente ao dia que o animal manifestou estro e a segunda no dia 10 do ciclo. Para o padrão de três ondas, as emergências ocorrem em média, nos dias 0, 9 e 16 do ciclo, sendo as duas primeiras anovulatórias (GINTHER et al., 1996; WILTBANK et al., 2011).

As variações quanto ao número de ondas, podem ocorrer em função de vários fatores, como dieta, manejo, produção de leite, período de lactação e pós-parto imediato (GINTHER et al., 1996). A nutrição pode influenciar a função ovariana devido ao fato de que a elevada ingestão de matéria seca promove maior metabolismo dos hormônios esteróides e conseqüentemente, concentrações plasmáticas inferiores (VASCONCELOS et al., 2003).

Figueiredo et al. (1997) comentaram sobre a existência de uma variabilidade individual nos dias de emergência de cada onda, ainda que não haja diferenças na fertilidade de animais que apresentam duas ou três ondas. Adicionalmente, citam ainda que a quantidade de ondas foliculares e os dias do período interovulatório podem variar entre os animais e, também, em um mesmo animal, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997).

### **2.2.3 Emergência da onda folicular**

A emergência da onda folicular é caracterizada por um crescimento sincrônico de mais de 20 pequenos folículos com diâmetro a partir de 2 mm (GINTHER et al., 1989, ALVAREZ et al., 2000; CARVALHO et al., 2008; ERENO, 2008). O número de folículos recrutados em novilhas zebuínas geralmente é maior que nas taurinas (ALVAREZ et al., 2000; CARVALHO et al., 2008).

Gong et al.(1996) acreditam que o número de folículos que emergem numa onda de crescimento está diretamente relacionado aos níveis circulantes de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo I), e que vacas tratadas com hormônio do crescimento (Somatotropina bovina-bST) podem aumentar o número de folículos recrutados. Além disso, existem indicações de que os animais *Bos indicus* apresentam níveis circulantes mais elevados de IGF-1 (ALVAREZ et al., 2000). Desta forma, Carvalho et al. (2008) sugeriram que os maiores níveis de IGF-1 plasmáticos

encontrados nestes animais, seria uma das razões para a grande atividade folicular durante a emergência da onda.

Cada onda folicular é precedida por um aumento nas concentrações circulantes de FSH (ADAMS et al., 1992). Após a emergência da onda, enquanto os folículos continuam a crescer, os níveis de FSH vão declinando até atingirem níveis basais (GINTHER et al., 1997a). Essa queda nas concentrações de FSH se dá pela ação do E<sub>2</sub> secretado pelos folículos em crescimento e da inibina pelo FD (GINTHER et al., 1996).

Aproximadamente 2,5 a 3 dias após a emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro em torno de 6,2 mm para fêmeas zebuínas (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006; GIMENES et al., 2008) e cerca de 8,5 mm para fêmeas taurinas (GINTHER et al., 1996) ocorre o desvio folicular (GINTHER et al., 2001).

#### **2.2.4 Desvio ou divergência folicular**

O desvio folicular é definido pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, marcada pela sequência no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros folículos (GINTHER et al., 1996).

O crescimento folicular até o momento do desvio é primariamente regulado pelo FSH e demais fatores de crescimento. Passando pelo desvio, as concentrações circulantes de FSH passam a ser inibidas. Neste momento, o folículo que se encontra cada vez maior passa a produzir E<sub>2</sub>. O folículo continua seu crescimento até que produza uma concentração de E<sub>2</sub> suficiente para induzir o pico de LH e ovulação deste folículo que se tornou dominante (WILTIBANK et al., 2002).

Em animais *Bos taurus*, o desvio tem início por volta do dia 2,8 após a emergência, quando o FD atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2 mm (GINTHER et al., 1996). Em novilhas da raça Nelore, esse período tem duração de 2,5 a 2,7 dias após a ovulação (GIMENES et al., 2005b; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006).

Os mecanismos envolvidos no processo de desvio folicular são complexos e não estão completamente compreendidos. Sabe-se que neste momento as concentrações de FSH encontram-se em níveis basais (GINTHER et al., 1997). Fatores intra-foliculares também são candidatos a ativação deste processo, tais como os fatores semelhantes à insulina (IGFs), esteróides, os peptideos ativina A e inibina A, receptores para

gonadotrofinas entre outros (BERISHA et al., 2003, FORTUNE et al., 2004, IRELAND, 2004).

A expressão do receptor de LH (LHR), em novilhas da raça Holandesa, foi detectada nas células da granulosa de folículos  $\geq 8$  mm, cerca de 8 horas antes do desvio folicular (BEG et al., 2001), o que levou os autores, a sugerir que o início da expressão do LHR nas células da granulosa seria a causa para a seleção e consequentemente para a aquisição da dominância folicular (BAO et al. 1997; BEG et al. 2001).

Contudo, Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e Ereno (2008) utilizando a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), não detectaram a expressão do LHR no futuro FD, imediatamente antes da seleção folicular. Nogueira et al. (2007) e Ereno (2008), verificaram que a expressão do LHR em células da granulosa de fêmeas da raça Nelore ocorre entre 7,0 e 8 mm de diâmetro folicular. Assim, estes últimos achados não corroboram com a hipótese da expressão de LHR em células da granulosa ocorre antes da divergência folicular.

Acosta e Miyamoto (2004), citam que o uso do doppler colorido pode mostrar mudanças na parede folicular durante o desenvolvimento folicular. Matsui et al. (2004) demonstraram, com a utilização desta técnica, que o desenvolvimento folicular está associado à angiogênese perifolicular e a atresia associada à regressão na vascularização folicular, confirmando que o suprimento sanguíneo folicular pode relatar de forma precisa o crescimento e a seleção folicular durante a primeira onda do ciclo estral.

### **2.2.5 Seleção do folículo dominante (FD)**

Não somente as gonadotrofinas, LH e FSH, estão envolvidos no processo de dominância folicular; vários fatores de crescimento, ainda não totalmente esclarecidos, entre eles os do sistema IGF, estão envolvidos nas modificações foliculares que ocorrem na fase de dominância (BEG e GINTHER, 2006).

Outros fatores que também parecem estar envolvidos incluem os fatores de crescimento (FGF; BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2007), o sistema renina-angiotensina (PORTELA et al., 2006; FERREIRA et al., 2010) e a kisspeptina (MESSAGER et al., 2005; OHKURA et al., 2008).

No FD, o crescimento em dimensão e o aumento da produção de  $E_2$  são acompanhados por uma diminuição nos níveis de inibina, ativina e as proteínas de ligação de IGF (IGFBP) e aumento do IGF-1 livre (FORTUNE et al., 2001). O IGF-1 é capaz de estimular a proliferação e diferenciação das células da granulosa e causar o

aparecimento de LHR nestas células (ARMSTRONG et al., 1996; SPICER e STEWART, 1996).

Próximo ao estro, o folículo pré-ovulatório, se destaca pelo seu tamanho e pela grande produção de  $E_2$ . Neste momento, o  $E_2$  circulante atinge concentração suficiente para induzir o comportamento estral, e induzir a um pico pré-ovulatório de LH (revisado em SARTORI e BARROS, 2011).

Ginther et al. (1989) demonstraram que o folículo dominante cresce cerca de seis dias até atingir diâmetro máximo, persistindo estático por alguns dias. O FD produz a inibina na granulosa, que interrompe o crescimento folicular, devido progressiva inibição da síntese e liberação do FSH provocando *feedback* negativo na hipófise, juntamente com  $E_2$  no hipotálamo impedindo o desenvolvimento de novos folículos.

Contudo, nesta última década foi descoberto um peptídeo que está mudando progressivamente o conceito sobre *feedback* durante a fase de dominância folicular. O GnIH (hormônio inibitório de gonadotrofinas) inicialmente isolado em hipotálamo de codornas, tendo sido demonstrado que inibe a secreção do LH da hipófise anterior *in vivo* e *in vitro* (TSUTSUI et al., 2000).

Kriegsfeld et al. (2006), detectaram que neurônios imunoreativos de GnIH possuem estreita relação com células GnRH, sugerindo uma possível interação entre neurônios GnIH e GnRH. Os GnIH transcritos de humanos e bovinos codificam três peptídeos denominados RFamide (RFRP-1, -2, e -3). Especificamente em bovinos, foi demonstrado que o RFRP-3 suprime *in vitro* a secreção de LH em cultivo de células de hipófise, bem como a frequência de pulsos de LH em machos castrados, porém vários estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de esclarecer a real função do GnIH na dominância folicular na espécie bovina (KADOKAWA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

O tamanho do FD da segunda onda é menor do que o da primeira e terceira ondas no padrão de três ondas foliculares (GINTHER et al., 1989; BORGES et al., 2004; SARTORI et al., 2004). Segundo Borges et al. (2004), uma possível explicação para a diferença nos diâmetros foliculares é a concentração plasmática de  $P_4$ . Estes autores explicam que a primeira onda folicular coincide com a baixa concentração de  $P_4$ , quando o CL está em formação, não tendo efeito *feedback* negativo satisfatório.

Já a segunda onda inicia-se na presença de um CL totalmente formado e que secreta elevada concentração de  $P_4$ , suficiente para inibir a liberação de LH, enquanto a terceira onda coincide com a redução da liberação de  $P_4$  pelo CL devido à sua regressão.

O menor diâmetro do folículo da segunda onda também pode ser devido à menor duração de crescimento desses quando comparados com folículos da primeira e terceira ondas (BORGES et al., 2004).

Ginther et al. (1989) descreveram a ocorrência de um intervalo menor entre a emergência do folículo ovulatório e a regressão do CL nos ciclos de três ondas, sendo de sete dias para duas ondas e de três dias para três ondas, relacionando o menor intervalo no ciclo de três ondas com a presença de folículos menores no momento da luteólise.

Conforme Fortune et al. (2004), o folículo dominante possui maior quantidade de mRNA para LHR nas células da granulosa e da teca quando comparados com folículos subordinados, mas os níveis de mRNA para os receptores de FSH (FSHR) nas células da granulosa não são diferentes.

Está bem documentado que o  $E_2$  endógeno produzido pelos folículos ovarianos acentua a amplitude dos pulsos de LH durante a fase folicular do ciclo estral, através do aumento de LHR na hipófise anterior e do consequente aumento da capacidade estrogênica dos folículos pré-ovulatórios (STUMPF et al., 1989). Esse mecanismo de retroalimentação positiva entre o  $E_2$  e o LH é crítico no processo de maturação final do folículo ovulatório, induzindo o comportamento estral e a ovulação (FIKE et al, 1997).

#### **2.2.6 Luteólise e ovulação**

Após a ovulação há a formação do CL, com progressivo aumento nas concentrações circulantes de  $P_4$ , produzida pelo próprio CL (revisado em SARTORI e BARROS 2011).

Moraes et al. (2001) mencionam que o CL começa a se organizar logo após a ovulação, mas nos ruminantes inicia seu funcionamento após um ou dois dias, com função plena após cinco dias.

As concentrações de  $P_4$  mantêm-se elevadas durante a vida do CL, e isso é essencial para o desenvolvimento embrionário, estabelecimento e manutenção de uma possível gestação. Em casos onde a fêmea se torna gestante, as concentrações circulantes de  $P_4$ , bloqueiam um futuro pico pré-ovulatório de LH e ovulação (revisado em SARTORI e BARROS 2011).

As concentrações circulantes de  $P_4$ , em vacas da raça Nelore alcançam o seu platô entre os dias 8 e 13 do ciclo estral, a funcionalidade do CL é regulada pelo LH originário da hipófise anterior, mas a sua regressão não pode ser atribuída à queda nos

estímulos luteotróficos (especialmente de LH), mas sim à presença de um fator luteolítico, a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ; FIGUEIREDO et al., 1997; MORAES et al., 2001; MACHADO et al., 2008).

O tempo de regressão do CL em vacas não gestantes é determinado pelo momento de secreção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo útero e CL, que ocorre entre os dias 16 e 19 do ciclo estral tanto em vacas zebuínas quanto em taurinas (FIGUEIREDO et al., 1997; ALVAREZ et al., 2000; SARTORI et al., 2004; MACHADO et al., 2008).

Após a luteólise a concentração plasmática de  $P_4$  diminui a valores abaixo de 1 ng/mL, permitindo um aumento na frequência dos pulsos de LH (WILTBANK et al., 2002). O aumento na frequência dos pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que passa a secretar quantidades crescentes de  $E_2$  (FORTUNE et al., 2001).

O  $E_2$ , na ausência de  $P_4$ , estimula a síntese de receptores de GnRH (GnRHR) na hipófise tornando-a mais sensível ao GnRH ao mesmo tempo em que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (HANSEL e CONVEY, 1983) e estimula a síntese de gonadotrofinas, resultando no pico de LH e consequente ovulação do folículo dominante (HURNIK, 1987).

### **2.3 Hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH)**

O GnRH ocupa papel importante na função reprodutiva dos mamíferos, principalmente pela regulação da síntese e liberação de gonadotrofinas hipofisárias que modulam a esteroidogênese e a gametogênese (SCHNEIDER et al., 2006).

O GnRH é um neuropeptídeo produzido por neurônios específicos, localizados na região pré-óptica hipotalâmica, liberado de maneira pulsátil e sincrônica na extremidade dos axônios localizados próximos à rede de vasos do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (ESTES et al., 1977). Essa localização privilegiada permite a interpretação de informações centrais e periféricas, conferindo a este neurohormônio um papel central na reprodução animal (OLIVEIRA et al., 2010).

O GnRH liga-se aos receptores específicos da superfície celular que ativam as proteínas G, que por sua vez ativam a enzima adenilciclase, responsável em transformar adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato (AMPc; 2º mensageiro) no citoplasma. Este segundo mensageiro ativa quinases protéicas, desencadeando a formação de novas proteínas. O GnRH, agindo na adenohipófise regula síntese e liberação de LH e FSH e também a expressão dos seus receptores (GnRHR) (SENGER, 2003; KRIEGSFELD, 2006; SCHNEIDER et al., 2006; SCHILLO, 2009).

## 2.4 Agonistas de GnRH (GnRHa)

Os agonista sintéticos de GnRH (GnRHa) são substâncias artificiais que mimetizam o GnRH endógeno, levando primeiramente a um rápido aumento na secreção de FSH e LH (HEBERT e TRIGG, 2005). Devido a essa ação, os GnRHa vem sendo empregado há muito tempo no tratamento de condições patológicas anovulatória nos bovinos, tais como os cistos foliculares (SANTOS et al., 2009), e também para induzir a ovulação em protocolos de sincronização do ciclo estral (SCHMITT et al, 1996; PURSLEY et al, 1998).

Contudo, quanto empregados por tempo prologado, após algum tempo a hipófise para de produzir os hormônios, impedindo a ovulação (HEBERT e TRIGG, 2005).

Diversos GnRHa, vem sendo empregados na prática veterinária a fim de se obter esse efeito prolongado (Tabela 1), esses fármacos apresentam meia-vida maior na circulação sanguínea e maior afinidade de ligação aos GnRHRs; essas propriedades permitem que os GnRHa sejam utilizados em doses mais baixas com a mesma eficácia do decapeptídeo natural (D'OCCHIO et al., 1996; GONG et al., 1996; DAVIS et al., 2003).

O desenvolvimento desses análogos visou inicialmente a produção de agonistas com alta afinidade aos GnRHR e alta resistência a degradação ou eliminação. Contudo, com o passar do tempo, descobriu-se que esses “superagonistas” apresentavam efeitos anti-reprodutivos. As interações entre a potência e duração do tratamento com GnRHa, determina se o efeito será pró ou anti-fertilidade (KARTEN e RIVIER, 1986).

**TABELA 1:** Nomes comerciais, formulação, via de administração e potência relativa de alguns agonistas do GnRH de ação prolongada. Botucatu, 2012.

| Agonista                      | Nome comercial | Potencia | Formulação e via               | Duração (meses) |
|-------------------------------|----------------|----------|--------------------------------|-----------------|
| <b>Azagly-Naferalina</b>      | Gonazon®       | 50-100   | Implante / subcutâneo          | 3               |
| <b>Buserelina</b>             | Suprefact®     | 15-30    | Implante / subcutâneo          | 3               |
| <b>Acetato de deslorelina</b> | Suprelorin®    | 114-150  | Implante / subcutâneo          | 6-12            |
| <b>Leuprolide</b>             | Lupron Depot®  | 15       | Microesferas/<br>intramuscular | 1, 3 ou 4       |

Adaptado de GOBELO, 2007 e HERBERT e TRIGG, 2005

A administração contínua por longo prazo em vacas tem sido realizada com o emprego de mini-bombas (GONG et al., 1996), bomba de infusão intravenosa contínua (VIZCARRA et al., 1997), implantes de colesterol biocompatíveis (HERSCHLER e VICKERY, 1981; D'OCCHIO et al., 1996, 2002), matrizes poliméricas revestidas (D'OCCHIO et al., 1996) e microesferas biodegradáveis (ROBERTS et al., 1989).

A resposta ao tratamento crônico com GnRHa possui dois componentes, a fase aguda do tratamento, que pode durar por vários dias, caracterizada por um aumento repentino das concentrações plasmáticas de LH e FSH, seguida pelo retorno as concentrações basais (MELSON et al., 1986; GONG et al., 1995, 1996). E uma fase crônica, caso a exposição ao GnRHa torne-se contínua, levando ao bloqueio da secreção de LH (D'OCCHIO e ASPDEN, 1996). Como consequência ocorrerá a *downregulation* dos GnRHR nas células gonadotróficas e um desacoplamento das vias pára o 2º mensageiro no interior das células (MELSON et al., 1986; HAZUM e CONN, 1988). Esta falta de secreção pulsátil de LH e FSH é mantida por um longo tempo, provavelmente pelo GnRHa estar acima de um limiar na circulação sistêmica (D'OCCHIO e ASPDEN, 1996).

Vacas Holandesas de alta produção tratadas com implante subcutâneo contendo 2100 µg de GnRHa (desloreline) apresentaram supressão do LH, indicando dessensibilização dos receptores gonadotróficos (GONG et al., 1996). A ausência da ovulação após injeção com GnRH, confirma que a secreção de grandes quantidades de LH não ocorreu (MATTOS et al., 2001), corroborando com relatos prévios, nos quais bovinos desafiados com GnRHa tiveram respostas ao LH atenuadas ou completamente abolidas após tratamento crônico (GONG et al., 1996).

#### **2.4.1 Acetato de desloreline**

O acetato de desloreline é um dos GnRHa mais utilizados na prática reprodutiva veterinária (PETERS, 2005). Possui uma potência 144 vezes maior do que o GnRH endógeno e 7,2 vezes maior que outro GnRHa, a buserelina (AMBROSE et al., 1998; PADULA, 2005).

O GnRH sintético desloreline é produzido pela substituição da glicina na posição seis pelo triptofano, retirando a glicina da posição dez e adicionando uma amida na prolina da posição nove (Figura 1). Estas substituições conferem maior resistência à proteólise e alta afinidade da desloreline com os GnRHR. A natureza hidrofóbica do triptofano na posição seis estabiliza a configuração ativa da molécula de desloreline e

sua proteína de ligação aumenta na circulação, prolongando à meia-vida (PADULA, 2005).

O domínio NH<sub>2</sub> terminal, é predominantemente responsável pela ativação do receptor. A substituição do domínio NH<sub>2</sub> terminal pode afetar a ativação do GnRHR (SEALFON et al., 1997).

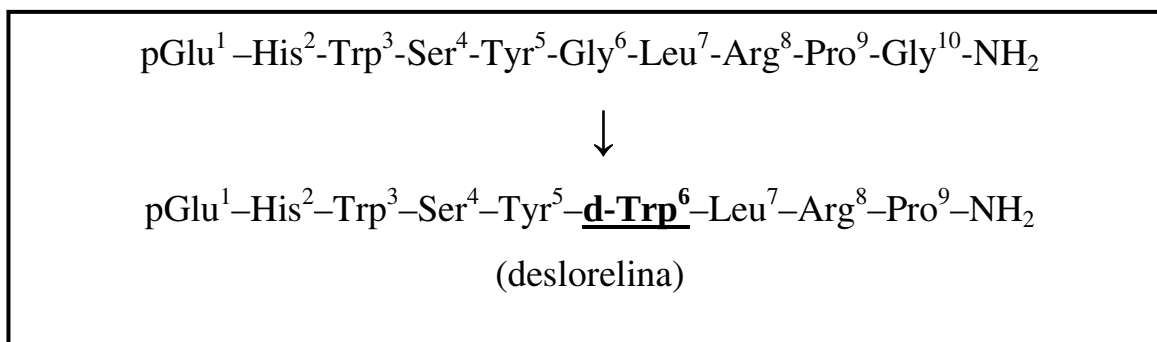


**FIGURA 1.** Sequência do aminoácido de GnRH e do acetato de deslorelina em mamíferos (Adaptado de Padula, 2005).

Interações entre dose, potência e duração do tratamento, determinam em larga escala, se os efeitos do acetato de deslorelina serão pro ou anti-fertilidade (PADULA, 2005). Implantes contendo deslorelina tornaram-se disponíveis para fins de investigação sobre a inibição da prenhez em vacas e novilhas (D'OCCHIO et al., 2002).

O uso de injeções repetidas de deslorelina, uma ou duas vezes por semana, por um período de dois meses, alterou significativamente os ciclos ovarianos de algumas vacas. Houve respostas individuais variadas que foram do anestro completo, a ciclos irregulares (PADULA e MACMILLAN, 2005).

Ensaio em larga escala com deslorelina em vacas têm demonstrado que implantes contendo doses mais elevadas do agonista (12 mg) pode inibir a reprodução por mais de 300 dias em 100% dos animais e em mais de 400 dias em 90% dos animais. Uma das vantagens dos GnRHa está na contracepção, que pode ser obtida após aplicação única, sem a necessidade de reaplicação (D'OCCHIO et al., 2002).

Implantes absorvíveis de deslorelina contendo doses médias e baixas foram colocados em novilhas zebuínas, de 14 a 23 meses de idade, destinadas a coberturas futuras, para verificar a capacidade do hormônio em promover a supressão temporária da fertilidade. O tratamento com baixas e médias doses reduziu significativamente a proporção de novilhas que pariram. Estes resultados indicam que bioimplantes contendo

deslorelina tem potencial de aplicação no controle do tempo da primeira concepção em novilhas mantidas em manejos extensivos (D'OCCHIO et al., 2000).

Ambrose et al. (1998) observaram que as vacas que receberam o implante de acetato de deslorelina apresentaram melhor taxa de crescimento do CL, e maiores concentrações plasmáticas de  $P_4$  comparadas ao grupo controle, concluindo-se que uma liberação prolongada de GnRH fornecida pelo implante de deslorelina induziu um pico de LH de duração maior e portanto, estimulou de forma mais efetiva a diferenciação e o crescimento do CL, aumentando assim sua funcionalidade.

Coletivamente, o uso de uma dose baixa de deslorelina, resulta em função luteal normal ou melhorada, associada a uma supressão transitória no desenvolvimento do folículo, o que pode aumentar a fertilidade (AMBROSE et al., 1998; RAJAMAHENDRAN et al., 1998; D'OCCHIO et al., 2000; BARTOLOME et al., 2004), visto que vacas com maiores CL têm maior secreção de  $P_4$  e, consequentemente, melhor desenvolvimento embrionário inicial e maior taxa de prenhez (VASCONCELOS et al., 2001).

Outro benefício do acetato de deslorelina é a indução da ovulação em vacas leiteiras. Ambrose et al (1998) verificaram que quando utilizado como a última injeção de GnRH, na dose de do protocolo *Ovsynch* ou no 5º dia do ciclo estral, induziu maior secreção de LH quando comparado a outro agonista, a buserelina (RAJAMAHENDRAN et al., 1998).

O acetato de deslorelina também vem sendo usado em animais durante o período do puerpério. Padula et al. (2000) demonstraram em vacas leiteiras sensibilidade ao tratamento com deslorelina aplicada durante três dias consecutivos no pós-parto imediato, o que resultou em um prolongado período de anestro pós-parto. Contudo, outros estudos visaram a redução do anestro pós-parto, utilizando tratamentos a base de GnRHa, em diferentes esquemas pela avaliação da capacidade de induzir o breve retorno da ciclicidade (ADAMS, 2005).

A fertilidade do período pós-parto é influenciada negativamente pela incidência de anestro. Esta ultima condição é caracterizada pela ausência de comportamento de estro, que pode ser uma indicação de condições de qualidade inferior (por exemplo, a alimentação inadequada periparto) ou de condições patológicas (por exemplo, doenças crônicas debilitantes ou doenças do útero e ovários). Embora o início do crescimento

folicular ovariano durante o período pós-parto, geralmente não seja afetado, o desenvolvimento subsequente (desvio) e o destino do folículo dominante são os principais fatores que afetam o restabelecimento da ciclicidade ovariana (PETER et al., 2009).

A administração do acetato de deslorelina, na forma de implantes em vacas lactantes no pós-parto imediato, e capaz de suprimir o crescimento folicular, reduzir as concentrações de estradiol e atrasar tanto o desenvolvimento do CL, como suas concentrações de progesterona (MATTOS et al., 2001).

Um experimento envolvendo tratamentos contínuos com agonistas GnRH (deslorelina, 5mg) durante o período de involução uterina, apresentou uma multiplicidade de efeitos, dentre eles, relatam-se a involução física do útero e colo do útero, aumento da tonicidade da parede uterina, que culminam com a redução de descargas uterinas (SILVESTRE et al., 2009a). No entanto, uma condição anovulatória prolongada após a retirada do tratamento impõe uma barreira a fertilidade normal devido a redução da atividade ovariana (SILVESTRE et al., 2003).

Foi demonstrado também que a influencia continua de agonistas GnRH por mais de uma semana, pode comprometer a atividade ovariana prejudicando o desenvolvimento de folículos e oócitos bovinos (SCHNEIDER et al., 2006). Portanto, uma dose menor de deslorelina pode ter efeito positivo sobre a involução uterina sem uma condição anovulatória prolongada como mostrou Mattos et al., (2001), onde vacas receberam um implante degradável contendo 2,1 mg de deslorelina no 7º dia pós-parto obtendo resposta a um protocolo de sincronização de cio com ovulação no 69º dia pós-parto.

Mais investigações são necessárias sobre o efeito da deslorelina com doses ajustadas em tratamentos que visam otimizar a involução uterina e a ativação sincronizada da atividade ovariana em vacas leiteiras de alta produção.

**OBJETIVOS**

### 3 Objetivos

O presente estudo teve por objetivo avaliar em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas por longo prazo (70 dias) com implantes subcutâneos de agonista de GnRH (deslorelina- -Suprelorin<sup>®</sup> 4,7 mg) as seguintes variáveis:

1. Dinâmica folicular ovariana e concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH), do hormônio luteinizante (LH) e da progesterona (P<sub>4</sub>) durante os últimos 20 dias do tratamento.
2. Dinâmica folicular e concentrações plasmáticas de progesterona (P<sub>4</sub>) da remoção do implante até a detecção da primeira ovulação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 Material e métodos

As condições experimentais obedeceram às normas éticas de utilização de animais em experimentos, adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; **Protocolo 68/2008**) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista.

### 4.1 Animais experimentais e instalações

Quinze vacas adultas, não lactantes, da raça Nelore, clinicamente normais com escore de condição corporal (ECC)  $\geq 3$  (0-5, HOUGHTON et al., 1990), durante os meses de julho a outubro foram mantidas em pastejo de *Brachiara decumbens* e suplementadas com ração 18% de proteína bruta, minerais e água *ad libitum*, na Fazenda Experimental da FMVZ /UNESP-Botucatu, no município de São Manuel/SP (latitude 22°43'52'', longitude 48°34'14''), Brasil.

### 4.2 Sincronização da ovulação

Primeiramente os animais passaram pela sincronização da ovulação, realizada por meio do protocolo hormonal (Figura 2).

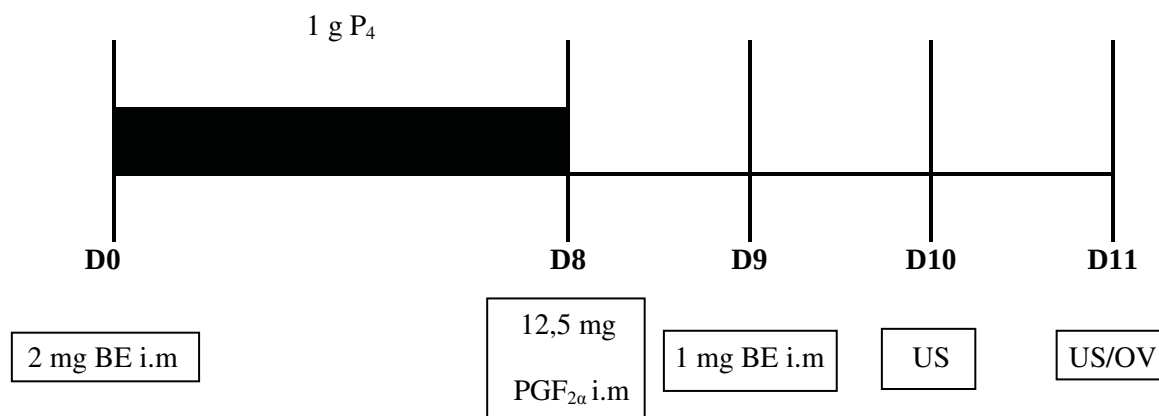


**FIGURA 2.** Protocolo de sincronização da ovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*). BE (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet Ltda, Brasil); P<sub>4</sub> (DIB<sup>®</sup>, Intervet Schering-Plough, Brasil); PGF<sub>2α</sub> (Dinoprost trometamina, Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Brasil); D10 e D11: exame ultrassonográfico transretal a cada 12 horas para determinação da ovulação.

### 4.3 Tratamento com deslorelina

Passados onze dias do início do protocolo de sincronização, todos os animais haviam ovulado em resposta ao protocolo empregado, e neste mesmo dia dos 15

animais, 10 foram selecionados para receberem um implante subcutâneo não degradável de 4,7 mg do agonista de GnRH ( acetato de deslorelina-Suprelorin<sup>®</sup>, Peptech Animal Health, North Ride, Austrália) na face externa do pavilhão auditivo direito (Figura 3). Para descrição e diferenciação dos animais, cada um recebeu uma numeração que variou de 1 a 10.

Dos 10 animais inicialmente selecionados, apenas sete permaneceram no estudo até o seu final. Os motivos dos descartes foram: um animal não apresentou luteólise após a administração da PGF<sub>2α</sub>, um teve que ser sacrificado após queda no tronco durante os procedimentos experimentais, que resultou em paresia dos membros anteriores, seguida da tetraparesia, e um foi excluído após o diagnóstico de infecção uterina.



**FIGURA 3.** Aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin<sup>®</sup> 4,7mg) nos animais experimentais. Fonte: Cedidas por Marques Filho, W. C. (2012).

Antes da realização do procedimento o local foi higienizado com água e sabão, seguida de deposição de iodo degermante com gaze. Cinco minutos antes da deposição da deslorelina, foi feito um botão anestésico pela infiltração subcutânea de 3 mL de lidocaína (Xylestesin 2%<sup>®</sup>, Cristália, Brasil).

Oito dias após a colocada do implante os animais receberam 12,5 mg i.m dinoprost trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Brasil). O implante de

deslorelina foi mantido por 70 dias. No dia de sua remoção foram seguidos os mesmos cuidados anti-sépticos e anestésicos empregados no momento da colocação do implante.

#### **4.4 Avaliações ultrassonográficas**

A partir do dia da implantação subcutânea da deslorelina, por um período de 50 dias os ovários dos animais foram examinados semanalmente, com auxílio do aparelho ultrassonográfico transretal (Mindray DP 3300, Mindray Biomedical Electronics Co. Ltda, Shenzhen, China), com transdutor de 5MHz.

Após este período as avaliações passaram a ser realizadas em um intervalo menor, por volta de 2-3 dias até que fosse detectada a ovulação do folículo dominante.

Nas avaliações após a colocada e a remoção do implante foram registrados o número de folículos e classificados de acordo com o diâmetro: Folículos classe I (<0,4 cm); Folículos classe II (0,4 – 0,6 cm); Folículos classe III (>0,6 cm).

Para uma melhor compreensão do período experimental, ficou determinado como dia zero (D0) o dia da remoção do implante subcutâneo de deslorelina, sendo dividido em duas fases; pré-remoção do implante, que compreendeu os últimos vinte dias de tratamento com a deslorelina até a sua remoção (D-20→D0) e pós-remoção do implante, que compreendeu o dia da remoção até a ovulação de cada animal (D0 →Dov)

A cada avaliação foram identificados e determinados o diâmetro dos folículos ovarianos presentes e investigada a presença de CL. Os dados obtidos foram utilizados para caracterizar o padrão de desenvolvimento folicular de cada indivíduo.

#### **4.5 Dosagem hormonal**

Amostras de sangue destinada à determinação da concentração plasmática de FSH, LH e P<sub>4</sub> foram colhidas por meio da punção dos vasos coccígeos com auxílio de agulha 21 G e sistema à vácuo em tubos heparinizados. Imediatamente após a coleta, estas amostras foram refrigeradas e posteriormente centrifugadas a 2500xG por 15 minutos. O plasma obtido foi acondicionado em tubos tipo eppendorf e armazenados em freezer a -20°C.

Para a dosagem de P<sub>4</sub> foram colhidas amostras nos dias -20, -16, -14, -13, -10, -08, -06, -02 e no dia da remoção do implante de deslorelina (D0) e, após a remoção do implante, a cada 2-3 dias até a detecção da ovulação. Para a dosagem de LH e FSH foram colhidas amostras nos dias -50, -43, -33, -28, -09, antes da remoção do implante

de deslorelina.

A mensuração plasmática da P<sub>4</sub> foi realizada pela técnica de radioimunoensaio usando Count-A-Count Kit (Diagnostics Products Corporation®, Los Angeles, CA, USA) com coeficiente de variação interensaio e intraensaio de 6,35% e 4,87%, respectivamente. O nível sérico de FSH e LH, em todas as análises, foi mensurado pelo teste de radioimunoensaio de duplo anticorpo no laboratório de endocrinologia da UNESP-Araçatuba utilizando a técnica modificada de Bolt e Rollings (1983) e a classificação de pulsos de Fitzgerald et al. (1985).

Para o ensaio de FSH, utilizou-se o USDA-bFSH para iodinação, e primeiro anticorpo NIDDK-anti-oFSH-1 a uma diluição de 1:300.000. A sensibilidade do ensaio de FSH foi de 0,005 ng/mL e a de LH de 0,02 ng/mL. Os coeficientes de variação intraensaio foram 4,09% e 5,06%, respectivamente. O coeficiente inter-ensaio do LH foi de 6,37%.

#### **4.6 Análise estatística**

Para a expressão dos resultados do estudo foram empregados a média e o desvio padrão, respectivamente, como medidas de tendência central e variabilidade dos dados

A comparação entre o número de folículos dentro de cada classe foi realizada por análise de variância e as diferenças entre as médias foram determinadas através do teste de Tukey, empregando o programa Bioestat 5.3 (AYRES et al., 2007). Foram consideradas significativas diferenças de  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 5 Resultados

### Período pré-remoção do implante de deslorelina

O protocolo de sincronização da ovulação empregado nos animais (Figura 2) apresentou 100% de eficácia, visto que 48 horas após a última aplicação do benzoato de estradiol, todos os animais já haviam ovulado.

Não foram observadas dificuldades na colocação do dispositivo subcutâneo do acetato de deslorelina, bem como reações locais, edema ou inflamação após o procedimento. No momento da remoção, apesar da fragmentação do dispositivo (Figura 5), a sua localização e remoção foram realizadas sem dificuldades por meio de uma incisão da pele, precedida de anestesia local; não foram observados problemas de cicatrização no local da incisão.



**FIGURA 4.** Implante subcutâneo não degradável de 4,7 mg do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin<sup>®</sup>, Peptech Animal Health, North Ride, Austrália) removido após 70 dias de tratamento. Fonte: Cedida por Marques Filho, W.C. (2010).

A dinâmica de desenvolvimento folicular dos animais durante os últimos 20 dias do período de tratamento está representada nas figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Durante os 70 dias em que permaneceram implantados com deslorelina os animais apresentaram desenvolvimento folicular na forma de ondas foliculares, sem que,

contudo, tenha sido observada a ocorrência de ovulações. Esse achado ultrassonográfico foi confirmado pelos resultados da concentração plasmática de P<sub>4</sub> que se manteve em média abaixo de 0,16 ng/mL (Tabela 2).

**TABELA 2.** Concentração plasmática de progesterona máxima, mínima e a média  $\pm$  desvio padrão (ng/mL) de vacas Nelore (*Bos indicus*) durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento com implante subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina -Suprelorin® 4,7 mg).

| <b>Dias antes da remoção<br/>da deslorelina</b> | <b>Média <math>\pm</math> desvio padrão<br/>(ng/mL)</b> | <b>Máxima (ng/mL)</b> | <b>Mínima<br/>(ng/mL)</b> |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>D-20</b>                                     | 0,12 $\pm$ 0,09                                         | 0,24                  | 0,01                      |
| <b>D-16</b>                                     | 0,13 $\pm$ 0,12                                         | 0,32                  | 0,01                      |
| <b>D-14</b>                                     | 0,24 $\pm$ 0,27                                         | 0,79                  | 0,01                      |
| <b>D-13</b>                                     | 0,18 $\pm$ 0,19                                         | 0,56                  | 0,01                      |
| <b>D-10</b>                                     | 0,18 $\pm$ 0,19                                         | 0,56                  | 0,01                      |
| <b>D-08</b>                                     | 0,31 $\pm$ 0,20                                         | 0,59                  | 0,02                      |
| <b>D-06</b>                                     | 0,23 $\pm$ 0,14                                         | 0,41                  | 0,01                      |
| <b>D-02</b>                                     | 0,05 $\pm$ 0,03                                         | 0,11                  | 0,01                      |
| <b>D0*</b>                                      | 0,05 $\pm$ 0,05                                         | 0,14                  | 0,01                      |
| <b>Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>     | 0,16 $\pm$ 0,09                                         |                       |                           |

\* D0 = dia da remoção do implante

O animal n°4 em consequência de trauma devido à queda no tronco de contenção apresentou paresia e foi transferido e tratado no hospital veterinário entre os dias -8 e 13. Nesse período não foi registrado o padrão de desenvolvimento folicular.

O animal n°7 ovulou 55 dias após a remoção do implante, porém foram perdidos os dados de dinâmica folicular deste animal a partir do dia 36 pós-remoção do implante de deslorelina, devido a um problema no arquivo em que estavam registradas as informações diárias do desenvolvimento folicular.

Durante o período pré-remoção, em quatro animais observou-se que o desenvolvimento folicular permaneceu com o diâmetro máximo no intervalo de 0,4 a 0,6 cm (figuras 5, 6, 7 e 8), enquanto nos três restantes foram alcançados diâmetros superiores (0,9 a 1,2 cm – figuras 9, 10 e 11).

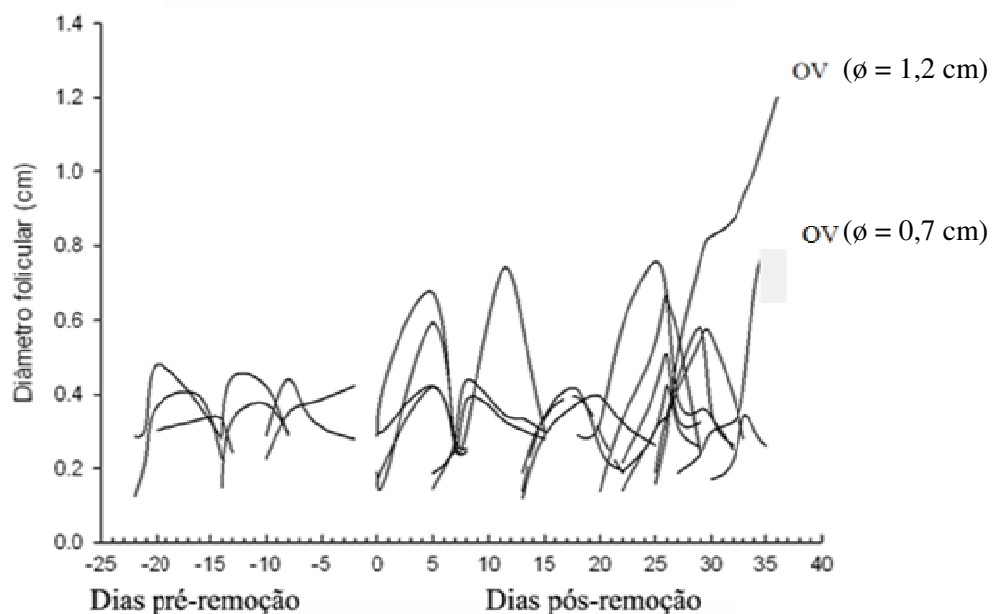


**FIGURA 5.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 1 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).

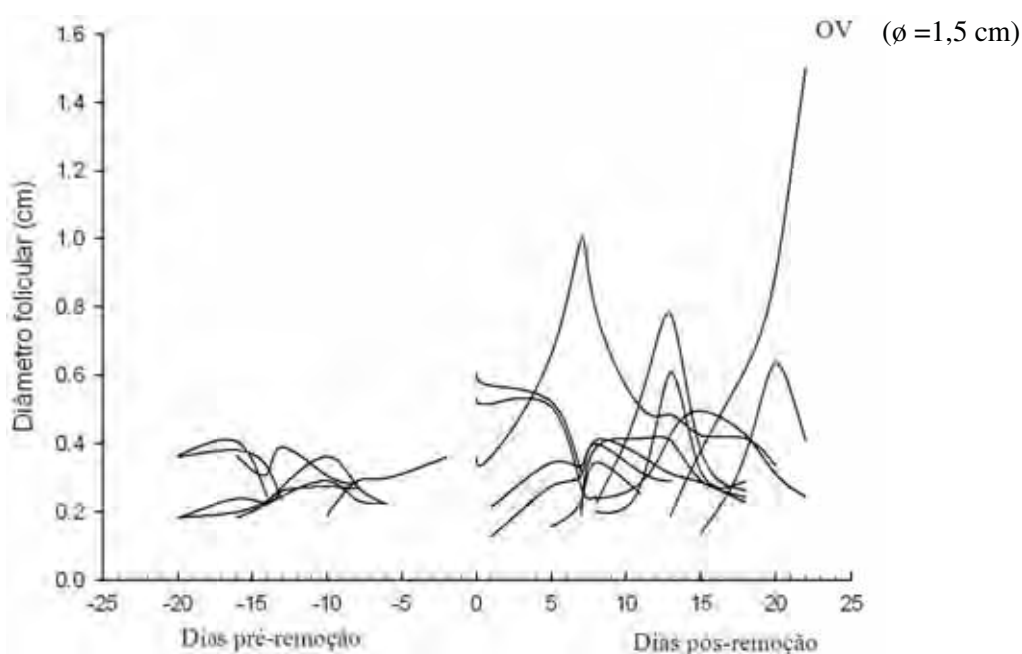


**FIGURA 6.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 2 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).

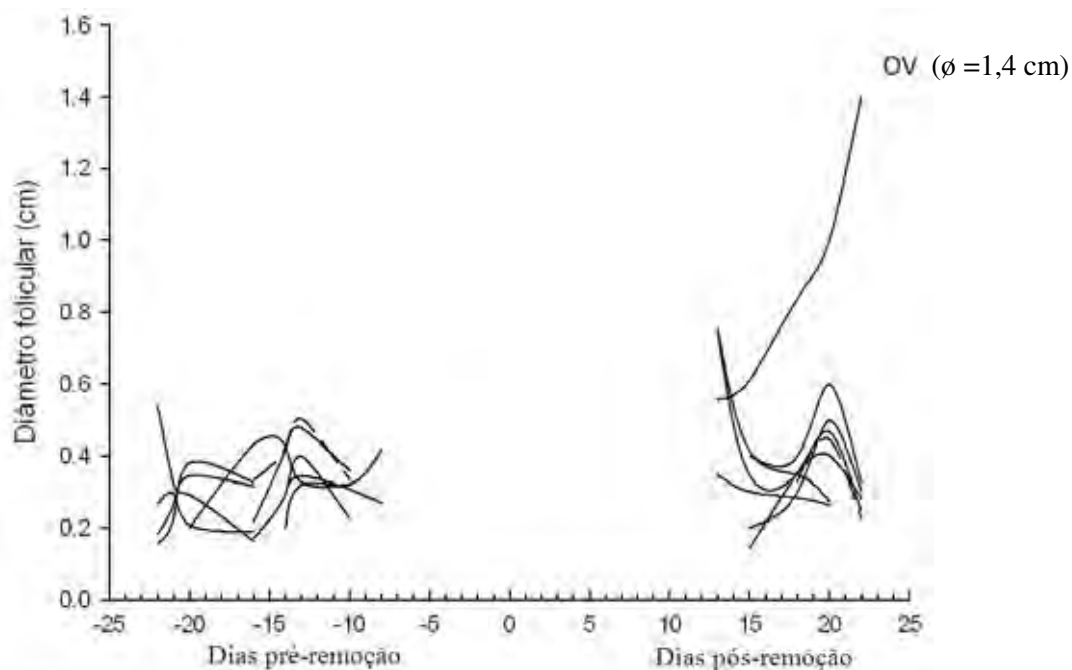


**FIGURA 7.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 4 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).

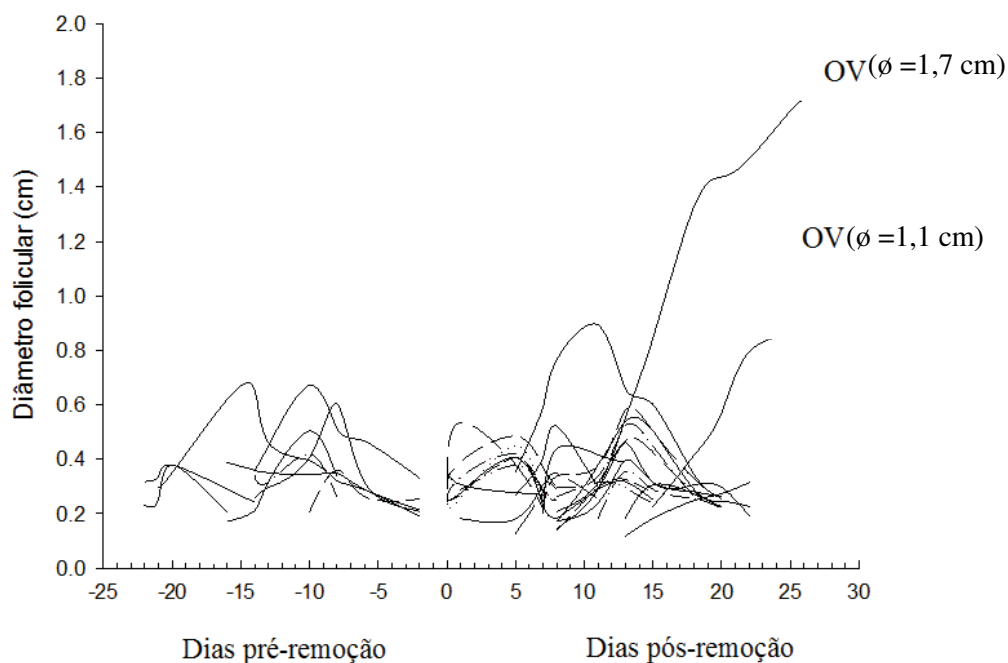


**FIGURA 8.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 6 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).

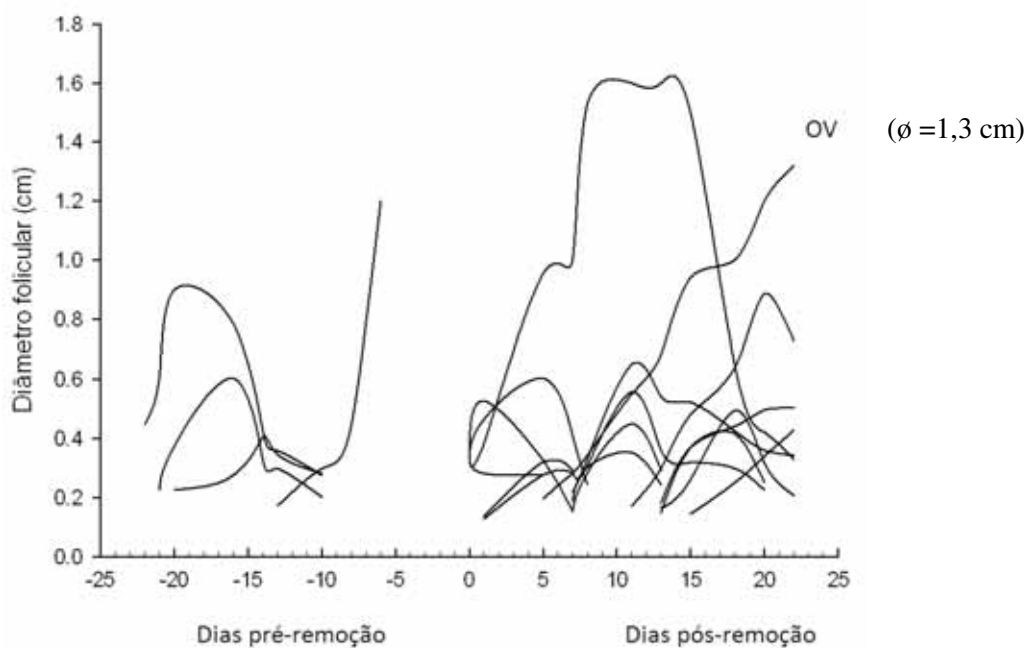


**FIGURA 9.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº3 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = Diâmetro do folículo pré-ovulatório).

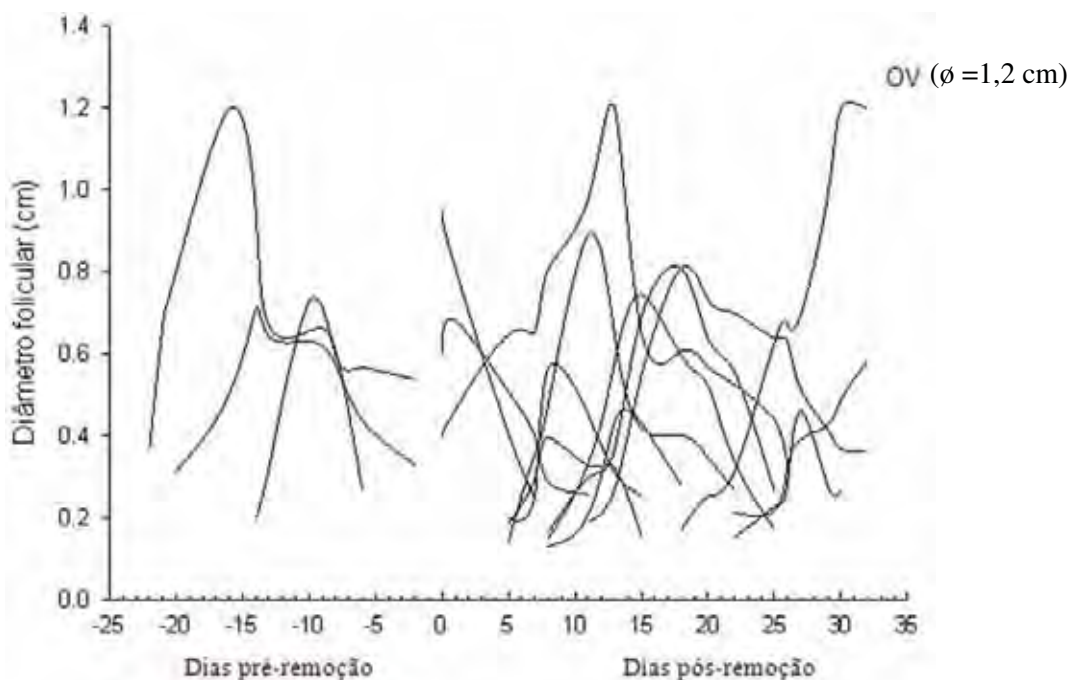


**FIGURA 10.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 5 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação (ov = ovulação; ø = diâmetro do folículo pré-ovulatório).

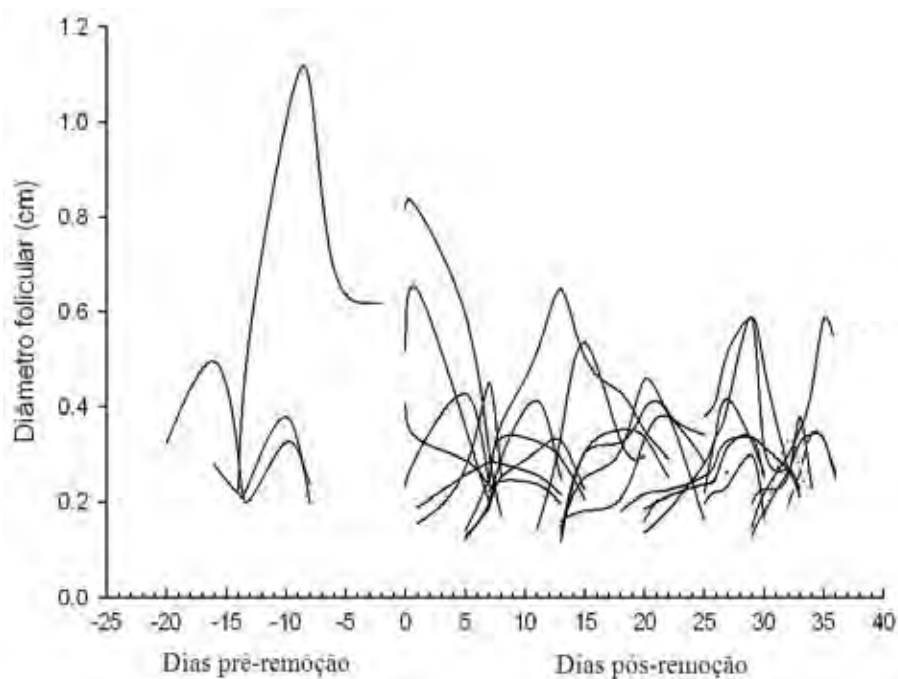


**FIGURA 11.** Padrão de desenvolvimento folicular da vaca Nelore nº 7 durante os últimos 20 dias de um período de 70 dias de tratamento subcutâneo com agonista de GnRH (deslorelina - Suprelorin® 4,7 mg – dias pré-remoção) e após a remoção do implante até a detecção da primeira ovulação.

Não houve variação da concentração plasmática de FSH durante o período de tratamento com a deslorelina, cujo valor médio foi de  $1,58 (\pm 0,04)$  ng/mL. (Tabela 3).

A concentração plasmática de LH também não variou ao longo do período de tratamento com a deslorelina, e o seu valor médio foi de  $1,22 (\pm 0,11)$  ng/mL (Tabela 3).

**TABELA 3.** Concentração plasmática de FSH e LH (ng/mL) em vacas Nelore (n=7) durante o período de tratamento de 70 dias com o agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin®)

| Concentração plasmática (ng/mL) - Dias pós-tratamento com deslorelina |                 |                 |                 |                 |                 |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                                                       | 20              | 27              | 37              | 42              | 61              |
| FSH                                                                   | $1,56 \pm 0,13$ | $1,69 \pm 0,19$ | $1,39 \pm 0,21$ | $1,57 \pm 0,12$ | $1,53 \pm 0,10$ |
| LH                                                                    | $1,12 \pm 0,21$ | $1,22 \pm 0,18$ | $1,21 \pm 0,11$ | $1,07 \pm 0,13$ | $1,37 \pm 0,47$ |

O número de folículos  $< 0,4$  cm observados não variou durante os últimos 20 dias do período de tratamento, exceto no dia da remoção do implante em que esse número

foi maior que o observado nos dias D-20 e D-16 ( $P < 0,05$ ). Durante esse mesmo período não foi constatada diferença com relação ao número médio de folículos de 0,4 a 0,6 cm e  $> 0,6$  cm de diâmetro ( $P > 0,05$ ) (Figura 12).

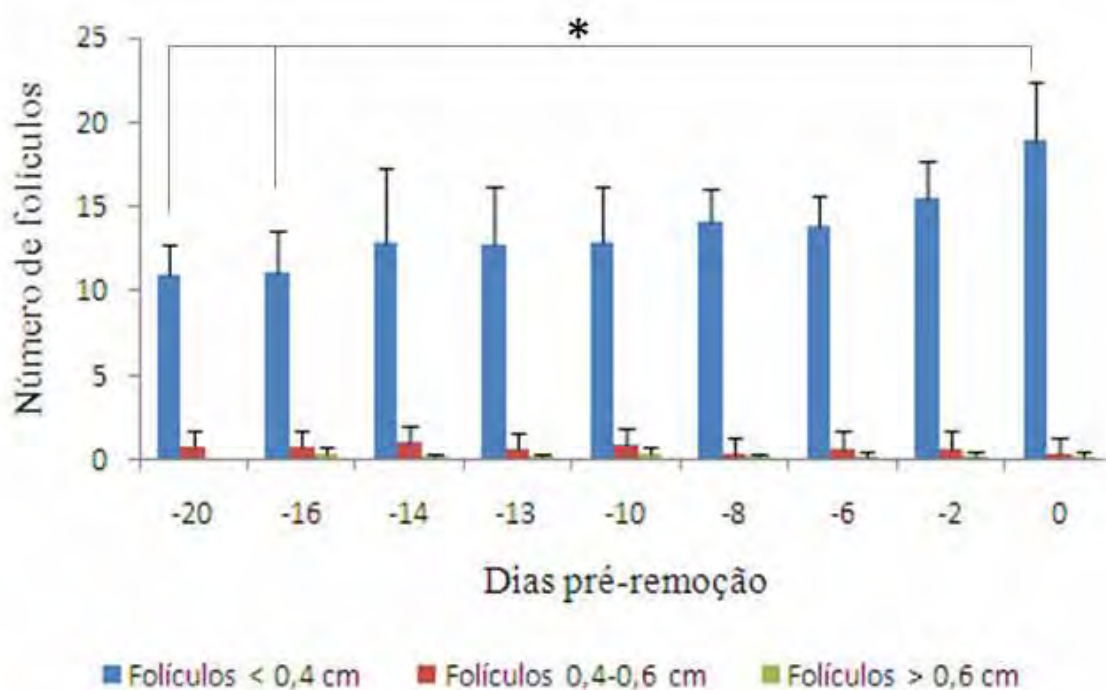


**FIGURA 12.** Número médio de folículos  $< 0,4$  cm, 0,4-0,6 cm e  $> 0,6$  cm em vacas Nelore (*Bos indicus*) durante os vinte dias que antecederam a remoção do implante subcutâneo do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin®) por 70 dias. \* indicam diferença significativa entre o número de folículos  $< 0,4$  cm nos D-20 e D-16 ( $P < 0,05$ ).

### Período pós-remoção do implante de deslorelina

Após a remoção do implante subcutâneo de deslorelina (Suprelorin® 4,7 mg), o período de restabelecimento da capacidade ovulatória foi de  $29,28 \pm 8,84$  e o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi de  $1,25 \pm 0,2$  cm. As concentrações plasmáticas de  $P_4$  nesse período mantiveram-se baixas, não ultrapassando  $0,15 (\pm 0,17)$  ng/mL. Os dados individuais dos animais relacionados ao tempo de restabelecimento da capacidade ovulatória e do diâmetro do folículo pré-ovulatório estão representados na Tabela 4.

**TABELA 4.** Intervalo entre o dia da retirada do implante do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin® 4,7 mg), a ovulação e o diâmetro do folículo pré-ovulatório em vacas Nelore (*Bos indicus*)

| Animal | Ovulação (dias) | Fol. pré-ovulatório (cm) |
|--------|-----------------|--------------------------|
| 1      | 36              | 1,2                      |
| 2      | 22              | 1,5                      |
| 3      | 22              | 1,3                      |
| 4      | 22              | 1,4                      |
| 5      | 32              | 1,2                      |
| 6      | 26              | 1,7                      |
| 7      | 55              | -                        |

Durante o período de restabelecimento da atividade ovariana os animais continuaram a apresentar desenvolvimento folicular na forma de ondas foliculares, que se repetiram continuamente até a ocorrência da ovulação. Nesse período os animais apresentaram dois padrões de crescimento folicular: O primeiro, observado em quatro vacas (4/7), caracterizou-se pelo desenvolvimento dos folículos que atingiam o diâmetro pré-ovulatório ( $> 0,8$  cm) e em seguida regrediram, o que era seguido pela emergência de novas ondas de crescimento folicular até que o desenvolvimento culminou com a ovulação (Ex. Figura 10 - vaca n°5).

O segundo padrão, observado em três animais (3/7), caracterizou-se pelo desenvolvimento folículos de diâmetros  $\leq 0,8$  cm, que regrediam e eram também seguidos pela emergência de novas ondas de foliculares (Ex. Figura 5 – vaca n°1). Alguns animais apresentaram os dois padrões.

Outro fenômeno observado foi a ocorrência de co-dominância folicular e dupla ovulação nas vacas n°1 e n° 6 (Figura 6 e 9). Após a remoção do implante de deslorelina até a detecção da 1ª ovulação, o número de folículos  $< 0,4$  cm e de  $0,4$  a  $0,6$  cm de diâmetro não variou ( $P>0,05$ ). Contudo, o número médio de folículos  $> 0,6$  cm de diâmetro foi maior no dia -3, comparados ao dia 21 ( $P<0,05$ ) (Figura 13).

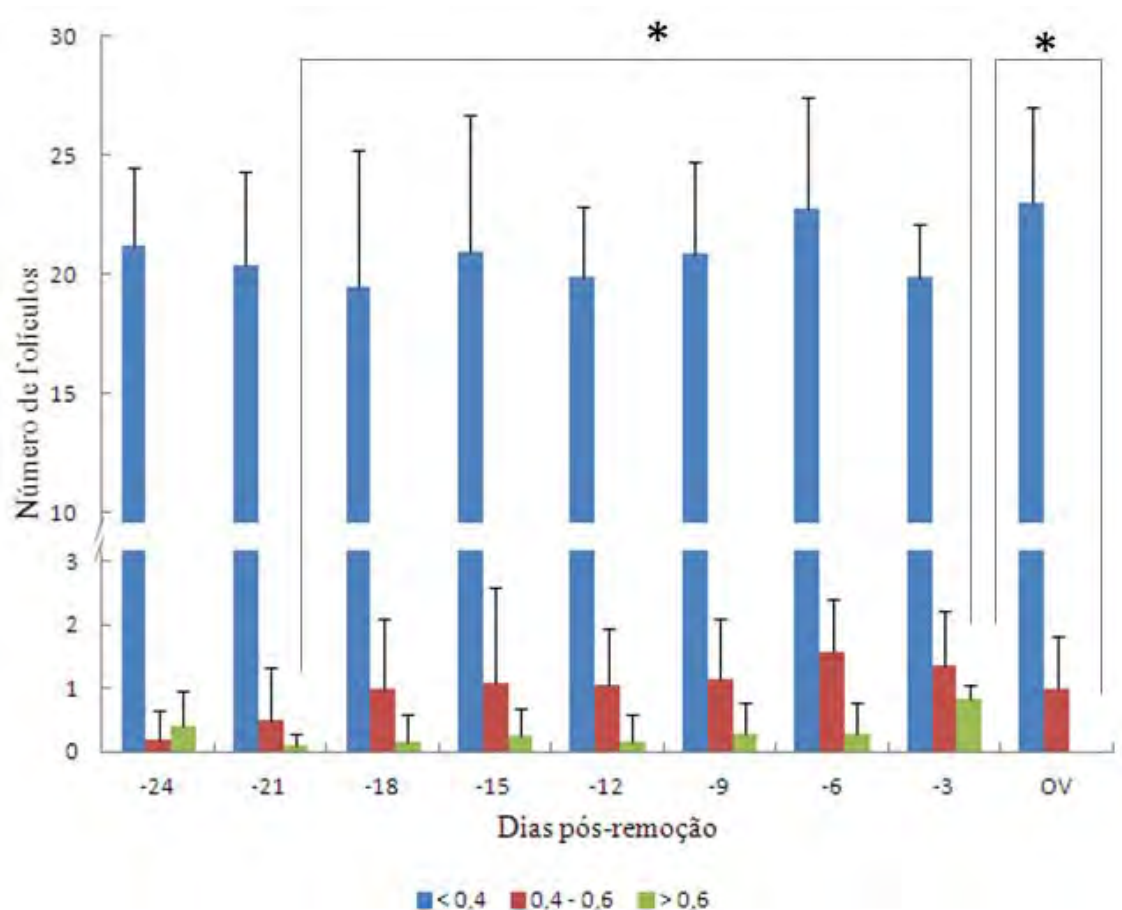


**FIGURA 13.** Número médio de folículos < 0,4 cm, 0,4-0,6 cm e > 0,6 cm em vacas Nelore (*Bos indicus*) após a remoção do implante subcutâneo do agonista de GnRH (deslorelina-Suprelorin®). \* indicam diferença significativa entre o número de folículos >0,6 cm nos D-21 e D-3 ( $P<0,05$ ).

## **DISCUSSÃO**

## 6 Discussão

Diversos estudos têm analisado o efeito supressor do uso prolongado de agonistas de GnRH sobre a função ovariana em *Bos taurus* (GONG et al., 1995, 1996; AMBROSE et al., 1998, 2005; D'OCCHIO et al., 2000, 2002; PADULA e MACMILLAN, 2004; SILVESTRE et al., 2009a, b). No presente estudo foi observado o mesmo fenômeno em animais da raça Nelore (*Bos indicus*). Os principais resultados obtidos foram à ausência da ovulação durante o período de tratamento, apesar de não ter sido observado a supressão do desenvolvimento folicular. Também ficou evidente que a supressão relacionava-se a presença do implante, pois após a remoção do implante ocorreu o restabelecimento da atividade ovariana e da capacidade ovulatória em todos os animais.

O protocolo de sincronização da ovulação empregado neste estudo foi eficaz uma vez que detectou-se a ovulação em todos os animais no exame ultrassonográfico realizado 48 horas após a segunda aplicação do benzoato de estradiol. Resultados semelhantes foram obtidos em vacas Nelore paridas, que apresentaram 90% de ovulação quando submetidas a esse protocolo (MENEGETTI et al., 2005).

A falha de luteólise em um animal experimental após a administração de PGF<sub>2α</sub> no oitavo dia pós-ovulação, também foi observado por Meira et al. (2006) em vacas Nelore, que receberam aplicação do agente luteolítico no nono dia após a ovulação. Essa falha provavelmente reflete diferenças individuais em relação a sensibilidade do CL aos agentes luteolíticos.

A presença de folículos entre 0,2 a 0,6 cm, em quatro dos sete animais experimentais ao longo dos 70 dias de tratamento com deslorelina, indica que estes apresentaram o fenômeno do recrutamento folicular, ocorrência essa sugestiva da disponibilidade de FSH, conforme relatado por Sartorelli et al. (2005) e Gimenes et al. (2008) que observaram que em vacas Nelore a disponibilidade de FSH é imprescindível para a ocorrência do recrutamento folicular. O FSH é o hormônio indispensável para o desenvolvimento dos folículos desde a emergência até o desvio, à medida que o folículo vai se desenvolvendo produz quantidades crescentes de E<sub>2</sub> e inibina, que por mecanismo retroalimentação negativa inibem a secreção de FSH (GINTHER, 2000).

Neste estudo, os animais apresentaram concentrações plasmáticas de FSH entre 1,0 e 1,5 ng/mL ao longo do período de tratamento, valores estes superiores aos observados por Bastos (2012) que verificaram em vacas Nelore a concentração

plasmática de FSH no momento da emergência da onda folicular era em torno de 1,1 ng/mL, sendo esta concentração suficiente para a emergência de uma onda folicular.

Os valores de FSH deste estudo ao longo de todo período de tratamento da deslorelina foram também superiores aos observados no momento da emergência da onda folicular após a aspiração do folículo dominante (0,381 ng/mL ) em novilhas Nelore tratadas com bST (BURATINI et al., 2000).

Este padrão de secreção do FSH difere do observado em novilhas Holandesas submetidas a injeções sequenciais de buserelina (5 µg), realizadas a cada 12 horas durante 30 dias. A supressão do FSH foi confirmada por meio de dosagens hormonais e pela ausência de desenvolvimento de folicular além do diâmetro de 0,5 cm após 30 dias do início das injeções (GONG et al., 1995, 1996). O mesmo grau de inibição do desenvolvimento folicular foi também descrito em vacas Holandesas pós-parto nas quais após 27 dias de tratamento com o implante subcutâneo de deslorelina (4,7 mg) a população folicular era composta exclusivamente por pequenos folículos (0,2-0,5 cm) (SILVESTRE et al., 2009a).

Contudo, a despeito das elevadas concentrações de FSH, três animais experimentais não apresentaram o desenvolvimento folicular além do diâmetro de 0,4-0,5 cm, demonstrando que a resposta folicular à disponibilidade sanguínea do FSH não foi homogênea. Uma provável explicação para essa constatação, além das diferenças individuais, pode ser que a despeito da concentração de FSH, para que os fenômenos relacionados ao crescimento folicular (emergência e alcance de um diâmetro pré-desvio) aconteçam deve haver uma dinâmica de diminuição e aumento sequenciais desse hormônio.

A ausência de ovulação observada durante período de tratamento com a deslorelina, nas vacas Nelore também foi observada nos estudos realizados com novilhas e vacas *Bos taurus* (D'OCCHIO et al., 2000). Esses autores observaram que a deslorelina impediu a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, devido aos seus efeitos crônicos sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que resultam na *downregulation* dos receptores hipofisários de GnRH; provavelmente esse mesmo fenômeno foi observado no nosso estudo.

Silvestre et al. (2009b) também atribuíram a ausência de ovulações às baixas concentrações plasmáticas de LH em vacas Holandesas (*Bos taurus*) implantadas subcutaneamente com deslorelina a partir do segundo dia após o parto.

O mesmo padrão de inibição da secreção do LH observado neste estudo foi também relatado por D'Occhio e Aspden (1996), em novilhas Brahman tratadas com GnRHa (deslorelina) por 56 dias, nas quais o pico-pré-ovulatório de LH foi suprimido, porém não foi constatado o bloqueio absoluto da liberação dos pulsos desse hormônio.

O padrão de desenvolvimento folicular dos animais do presente estudo sugere que houve supressão do pico pré-ovulatório de LH, essencial para a ovulação (CUPP et al., 1995; AMBROSE et al., 2005), porém não ocorreu inibição da liberação pulsátil de LH, visto que os folículos ultrapassavam o tamanho de desvio atingindo diâmetro considerado pós-desvio para a raça Nelore (0,6 cm; GIMENES et al. 2008; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006). Em alguns animais o desenvolvimento folicular alcançou diâmetros superiores aqueles considerados como compatíveis com a aquisição da capacidade ovulatória (GIMENES et al., 2008).

Contudo, esse padrão de desenvolvimento difere do observado por Gong et al. (1995, 1996) em novilhas Holandesas tratadas por 30 dias com buserelina, em que o pico e o padrão pulsátil de LH foram abolidos, o que resultou na supressão do desenvolvimento dos folículos que não ultrapassaram o diâmetro de 0,5 cm.

A observação do mesmo padrão de desenvolvimento folicular nos animais da raça Nelore deste estudo e em animais da raça Brahman (D'OCCHIO E ASPDEN, 1996), sugere que nessas raças os agonistas de GnRH, não exercem um bloqueio hipofisário tão intenso como o observado em *Bos taurus*. Essa diferença pode estar relacionada a diferenças na sensibilidade desses animais aos agonistas de GnRH, que talvez necessitem de maiores doses dos agonistas de GnRH para uma supressão mais intensa da secreção das gonadotrofinas.

O período de recuperação da capacidade ovulatória após a remoção do implante de deslorelina foi semelhante ao necessário a vacas com bom ECC para o restabelecimento da capacidade ovulatória pós-parto. Esse restabelecimento completo da atividade ovariana é caracterizado pela ocorrência da ovulação, dependente do pico pré-ovulatório de LH. No puerpério, a capacidade hipofisária plena da secreção de LH é recuperada somente após a exposição às baixas concentrações de  $P_4$  do período pós-parto; essa recuperação é dependente do restabelecimento dos estoques hipofisários desse hormônio que foram esgotados durante a gestação. O período de recuperação pós-parto dura aproximadamente 20-30 dias em vacas com bom ECC (WILLIAMS, 2005; PEREA-GANCHOU et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2007; PETER et al., 2009).

O período entre a remoção do implante subcutâneo de deslorelina e a primeira

ovulação nas vacas Nelore do presente estudo foi de 29 dias (variando entre 22 e 55 dias, entre os animais experimentais). Contudo, esse período foi o dobro do observado em outro estudo (PADULA E MACMILLAN, 2005) realizado com vacas Holandesas não lactantes tratadas por 7, 14 ou 21 dias com implantes subcutâneos de deslorelina, no qual a recuperação da capacidade ovulatória foi de aproximadamente 14 dias após a remoção do implante.

No estudo de Silvestre et al (2009a) a deslorelina foi usada com sucesso para diminuir a exposição uterina ao LH e FSH, e acelerar a involução uterina e, conseqüentemente, o intervalo entre partos.

Levando-se em consideração que mesmo após 70 dias de tratamento em pelo menos quatro dos sete animais do nosso estudo o desenvolvimento folicular ainda era compatível com a disponibilidade sanguínea de FSH e LH, é improvável que os animais da raça Nelore sejam beneficiados com a aceleração da involução uterina observada por Silvestre et al. (2009a) em animais da Raça Holandesa.

O diâmetro do folículo pré-ovulatório da primeira ovulação após a remoção do implante subcutâneo de deslorelina no nosso estudo (1,25 cm) foi semelhante ao observado por Padula e Macmillan (1,36 mm; 2005) em vacas Holandesas não lactantes. Contudo, foi menor que o descrito por Silvestre et al. (2009 a) utilizando o mesmo implante em vacas Holandesas pós-parto (1,85 cm). E no NELORE????

O exame da dinâmica folicular dos animais experimentais após a remoção do implante sugere que em quatro deles a capacidade de secreção de FSH foi recuperada rapidamente. De maneira geral observou-se que o desenvolvimento folicular alcançou diâmetros progressivamente superiores aos registrados durante o período de tratamento.

Essa recuperação assemelha-se à observada no período puerperal no qual logo após o parto a dinâmica folicular volta a se caracterizar pelo padrão de ondas foliculares em função da recuperação hipofisária da secreção de FSH. Contudo, a despeito do rápido retorno da ocorrência da emergência e do desvio folicular, a recuperação da capacidade de secreção do pico pré-ovulatório de LH é mais demorada e é determinante para a completa recuperação da função ovariana (WILLIAMS, 2005; PEREAGANCHOU et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2007; PETER et al., 2009).

Da mesma forma que o observado nos animais durante o puerpério, nos demais estudos que empregaram o uso contínuo de agonistas de GnRH para inibir o desenvolvimento folicular e a ovulação em bovinos (SILVESTRE et al., 2009, GONG et al., 1995, 1996), o restabelecimento da emergência e do desvio folicular foram

rapidamente verificados, enquanto que a capacidade ovulatória foi mais tardia. Isso parece ser decorrente do esgotamento das reservas hipofisárias de LH. Contudo, pode haver outras possibilidades, tais como a necessidade de um maior tempo de recuperação dos receptores hipofisários de LH.

No presente estudo, a ocorrência de ovulações duplas em duas vacas Nelore durante o período de restabelecimento da atividade ovariana após o período anovulatório induzido pelo tratamento com deslorelina, assemelha-se ao observado por Royal et al. (2000) e Sartori et al. (2004) em vacas *Bos taurus* nas quais relacionaram a ocorrência de duplas ovulações a situações em que o desenvolvimento folicular ocorria em ambiente endócrino de baixa concentração sanguínea de  $P_4$ . Nessas situações foram mais frequentes os fenômenos da co-dominância folicular e as ovulações duplas.

CONCLUSÕES

## 7 Conclusões

O tratamento de vacas Nelore (*Bos indicus*) com implantes subcutâneos de deslorelina (Suprelorin<sup>®</sup> 4,7 mg), por 70 dias resultou na perda da capacidade ovulatória durante o período de tratamento, apesar de não ter sido observado a supressão do desenvolvimento folicular.

A inibição da capacidade ovulatória relacionou-se à exposição continuada à deslorelina, sendo que após a remoção do implante ocorreu o restabelecimento completo da atividade ovariana e da capacidade ovulatória.

As concentrações plasmáticas de FSH e LH mantiveram-se constantes durante todo o período de tratamento com a deslorelina, contudo o implante não suprimiu a secreção de FSH. Os animais implantados mostraram comportamentos diversos com relação a inibição do desenvolvimento folicular, variando desde diâmetros inferiores 0,4 cm enquanto que alguns animais apresentaram diâmetros superiores a 1,2 cm.

O tratamento com deslorelina aboliu a ovulação durante o período em que os animais foram tratados.

Após a remoção do implante de deslorelina, a ovulação ocorreu em todos os animais, apesar das variações individuais, relacionadas ao tempo de restabelecimento da atividade ovariana.

## BIBLIOGRAFIA

## Bibliografia

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. IN: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. Proceedings... Porto Seguro. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 127-140, 2004.

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

ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, J.R.C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C; OLSON, T.A.; WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1291-1302, 2000.

AMBROSE, J.D.; PIRES, M.F.A.; MOREIRA, F.; DIAZ, T.; BINELLI, M.; THATCHER, W.W. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 50, p.1157-1170, 1998.

AMBROSE, J.D.; KASTELIC, J.P.; RAJAMAHENDRAN, R.; ALI, M.; DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. *Theriogenology*, v.64, p. 1457–1474, 2005.

ANTONIOLLI, C.B. Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação. 2002. 15f. Seminário (Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ARMSTRONG, D.T.; XIA, P.; GANNES, G.; TEKPETEY, KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle stimulating hormone on proliferation

and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.54, p.331-338, 1996.

AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S.; 2007: BioEstat 5.0- Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq, Brasília. 290p.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. *Reprodução em bovinos*. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232 p.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; MITH, G.W.; SMITH, M.F.; Salfen, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1158-1168, 1997.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; GIMINES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 205-211, 2007.

BASTOS, M.R. “Influência da alta e baixa ingestão alimentar na função ovariana em *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*”. 2008. 106f. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-441, 2001.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblastic growth factor (TGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v.67, p.162-171, 2004.

BOLT, D.J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle stimulating hormone. *Journal of Animal Science*, v.56, p.146-153, 1983.

BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; THAM, K. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JUNIOR, V.R.; GIOSO, M.M.; FONSECA, J.F.; CARVALHO, G.R.; MAFFILI, V.V. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.80, n.5, p. 346-354.

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

BURATINI JR., J.; PINTO, M.G.L.; CASTILHO, A.C.; AMORIM, GIOMETTI, I.C.; PORTELA, V.M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v.77, p.743-750, 2007.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, p. 167-175, 2008.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular

deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.98, p.189-96, 2006.

CLARKE, J.J. GnRH Secretion. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1988, Dublin. *Anais...* Dublin, 1988.

CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; BOBERSON, M.S.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Secretion of gonadotropins changes during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 $\beta$ -oestradiol. *Animal Reproduction Science*, v. 37, p.109-119, 1995.

D'OCCHIO, M.J.; ASPDEN, W.J. Characteristics of luteinizing hormone LH and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone LHRH and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biology and Reproduction*, v. 54, p. 45–52, 1996.

D'OCCHIO, M.J.; FORDYCEB, G.; WHYTEA, T.R.; ASPDEN, A.W.J.; TRIGG, T.E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 433-442, 2000.

D'OCCHIO, M.J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T.R.; JUBB, T.F.; FITZPATRICK, L.A.; COOPER, N.J.; ASPDEN, W.; BOLAM, M.J.; TRIGG, T.E. Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. *Animal Reproduction Science*, v.74, p.151–162, 2002.

DROST, D.V.M.M. *Training Manual For Embryo Transfer in Cattle*, Flórida: College of Veterinary Medicine, University of Flórida, 1995, 59 p.

ERENO, R.L. *Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas-Nelore antes, durante e após a divergência folicular*. 2008. 65f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, R.; GASPERIN B.; SANTOS, J.; ROVANI, M.; SANTOS, R.; GUTIERREZ, K.; OLIVEIRA, J.F.; REIS, A.; GONÇALVES, P.B. *Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave*. Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System, 2010.

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

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, São Paulo: Livraria Varela, 2001. cap. 3, p. 25-55.

FIKE, K. E.; DAY, M.L.; INSKEEP, E.K.; KINDER, J.E.; LEWIS, P.E.; SHORT, R. E.; HAFS, H.D. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *Journal of Animal Science*, v.75, p.2009-2015, 1997.

FITZGERALD, B. P.; I'ANSON, H. LEGAN, S. J. Changes in patterns of luteinizing hormone secretion before and after the Ovulation in the postpartum mare. *Biol. Reprod.*, p.33:316, 1985.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v.65, p.648-654, 2001.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. v.82–83, p.109–126, 2004.

GAUTAM, G.; NAKAO, T.; YAMADA, K.; YOSHIDA, C. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology*, v. 73, p.180–189, 2010.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). *Acta Sci. Vet.*, v.33, supl.1, p.210, 2005 [Resumo].

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 15, p. 852, 2008.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, v.87, p.223-230, 1989.

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

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

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

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.239-257, 2003.

GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. *Animal Reproduction Science*, v.100, p.1–13, 2007.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 105, p. 263-270, 1995.

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.

GÜNGÖR, O.; KAYA, M.; GÜRBULAK, K.; ORAL, H.; KAYA, S.; KAÇAR, C. Use of GnRH agonist (Deslorelin) in combination with PGF<sub>2α</sub> on the termination of pregnancy in bitches. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 16, p. 903-908, 2010.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*, 7. ed. Barueri, SP: Ed. Manole, 2004. cap. 4, p. 55-67.

HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the estrous cycle. *Journal of Animal Science*, v.57, p. 404-424, 1983. Supplementum 2.

HEBERT, C.A.; TRIGG, T.E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science*, v.88, p.141-153, 2005.

HOUGHTON, P.L. ; LEMENAGER, R.P. ; HENDRIX, K.S. ; MOSS, G.E.; STEWART, T.S. Effects of body composition, preand postpartum energy intake and stage of production on energy utilization by beef cows. *Journal of Animal Science*, v.68, p.1447-1456, 1990.

HURNIK, J.F. Sexual behavior of female domestic mammals. In: *Veterinary Clinics of North America.: Food Animal Practice.*, v.3, pag. 423-61, 1987.

IBGE (Instituto Brasileiro de Estatística e Geociência). **Comunicação Social, 26 de outubro de 2011**. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 21 de junho de 2012.

IRELAND, J.L.H.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; WINN, M.E.; BURNS, D.S.; IRELAND, J.J. Evidence for autocrine and paracrine roles of  $\alpha$ 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology*, v.145, p. 2784–2794, 2004.

KAWASHIMA, C.; FUKIHARA, S.; MAEDA, M.; KANEKO, E.; MONTROYA, C.A.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MATSUNAGA, N.; KIDA, K.; MIYAKE, Y.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*, v. 133, p. 155–163, 2007.

LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; FENECH, M.; HUNTER, R.H.F. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology*, v. 63, p.1298–1307, 2005

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

MANN, G.E.; ROBINSON, R.S.; HUNTER, M.G. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 67, p. 1256–1261, 2007.

MATTOS, R.; ORLANDI, C.; WILLIAMS, J.; STAPLES, C.R.; TRIGG, T.; THATCHER, W.W. Effect of an implant containing the GnRH agonist deslorelin on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.56, p.371-386, 2001.

MATSUI, M.; HAYASHI, K. G.; ACOSTA, T. J.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Rational change in the number of the follicles with blood flow during first follicular

wave in cycling cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Proceedings...*Porto Seguro. Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, p. 48. [resumos].

MELO, C. M.; PAPA, F. O.; MEDEIROS, A. S. L.; DELL'AQUA JR, J. A.; CARMO, M. T.; ARAUJO, G. M.; ALVARENGA, M. A. Efeito da deslorelina e do extrato de pituitaria equina na inducao da ovulacao em eguas. In: XIX Reuniao Anual da SBTE, 2005, *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p.193, 2005.

MENEGHETTI, M.; LOSI, T.C.; MARTINS JÚNIOR, A.P.; VILELA, E.R.; VASCONCELOS, J.L.M. 2005: Protocolos de sincronização de ovulação a base de progesterona e estradiol, em vacas de corte paridas. 3: Efeito do uso de ECP, Benzoato de Estradiol e GnRH como estímulo ovulatório. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 16, 2005, Goiânia. Anais: Resumo 188.

MEIRA, C.; PESSOA, V.M.; FERREIRA, J.C.P.; ARAUJO, G.H.; GIOSO, M.M.; BICUDO, S.D.; OBA, E.; ORLAND, C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F2 $\alpha$  analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *Journal of Veterinary Science*, v.7, p.387-390, 2006.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E.E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R.R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S.A.J.R. Kisspeptin directly stimulates gonadotrophin releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.102, p.1761-1766, 2005.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 4. ed. Porto Alegre, RS. Ed. Sulina, 1977, v.1. 1124p.

MORAES, J.C.F.; DE SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.33-56.

MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.523–533, 1990.

NILSSON, E.; PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.175, p.123-130, 2001.

NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI, JR. J.; PRICE, A. C. S.; CASTILHO, M. G. L.; BARROS, C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.74, p. 680-686, 2007.

OHKURA, S.; UENOYAMA, Y.; YAMADA, S.; HOMMA, T.; TAKASE, K.; INOUE, N.; MAEDA, K-I.; TSUKAMURA, H. Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides*, v.30, p.49-56, 2008.

OPSOMER, G., GROHN, Y.T., HERTL, J., CORYN, M., DELUYKER, H., DE KRUF, A. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology*, v. 53, p. 841–857, 2000.

PADULA, A.M., 2000. GnRH agonist induced anoestrus in the dairy cow. Ph.D. Thesis. University of Melbourne, Australia.

PADULA, A.M.; MACMILLAN, K.L. Restoration patterns for luteinising hormone and ovarian function following treatment with GnRH agonist implants (deslorelin) for 7, 14 or 21 days in cycling dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 11–24, 2004.

PADULA, A.M. GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction of Science*, v. 88, p. 115–126, 2005.

PEREA-GANCHOU, F.; BELLOSO, E. S.; STAGNARO, C. G.; CASTILLO, G. S.; FONSECA, H. H. Factors Affecting Fertility According to the Postpartum Period in

Crossbred Dual-Purpose Suckling Cows in the Tropics. *Tropical Animal Health and Production*, v.37, p. 559–572, 2005.

PETER, A.T.; VOS, P.L.A.M.; AMBROSE, D.J. Postpartum anestrus in dairy cattle-Review. *Theriogenology*, v.71, p. 1333–1342, 2009.

PETERS, K. E.; BERGFELD, E. G.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; MARIASCAL, V.; SANCHEZ, T. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biology Reproduction*, v. 51, p. 1248–1254, 1994.

PORTELA, V.V.; GONÇALVES, P.B.D.; FREITAS, V.J.F. A novel role for angiotensin-II in the regulation of proteasenexin-I expression and secretion in bovine follicles. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, 39., 2006, s.l. Proceedings... s.l.: 2006. (Abstract 452).

PURSLEY, J. R.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy losses, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2139–2144, 1998

RIZZO, A.; SPEDICATO, M.; MINOIA, G.; MUTINATI, M.; CINONE, M.; JIRILLO, F.; SCIORSCI, R.L. Follicular development in pregnant cows after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG): A new insight. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 31, p. 536-542, 2009.

RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.38, p.265-277, 1995.

ROYAL, M.D.; DARWASH, A.O.; FLINT, A.P.F.; WEBB, R.; WOOLLIAMS, J.A.; LAMMING, G.E. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 487–501, 2000.

SANTOS, R.M.; DÉMETRIO, D.G.B.; VASCONCELOS, J.L.M. Cisto ovariano em vacas de leite: incidência, resposta à aplicação de GnRH e desempenho reprodutivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.3, p.527-532, 2009.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.124, p. 244–250, 2011.

SCHAMS, D.; KOTWICA, J.; ELGER, W. The importance of progesterone for the timing of luteolysis and oestrous cycle length in sheep and cow. *Experimental Clinical Endocrinology Diab.* V. 106, p. 89, 1998.

SCHILLO, K.K. *Reproductive physiology of mammals: from farm to field and beyond*. 1.ed. New York, 2009. 453p.

SCHMITT, E.J., DIAZ, T., DROST, M., THATCHER, W.W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 1084–1091, 1996.

SCHNEIDER, F.; HELEIL, B.; ALM, H.; TORNER, H.; BECKER, F.; VIERGUTZ, T.; NURNBERG, G.; KANITZ, W. Endocrine, morphological, and cytological effects of a depot GnRH agonist in bovine. *Animal Reproduction Science*, v. 92, p. 9–28, 2006.

SCOT CONSULTORIA. [www.scotconsultoria.com.br/noticia](http://www.scotconsultoria.com.br/noticia). Acesso: 21 de junho de 2012.

SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2.ed. Washington: Current Conceptions, 2003. 314p.

SILVA, E.C. Comportamento sexual de touros Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: SBZ, 2004. p. 468-482.

SILVESTRE, F. T.; KAMIMURA, S.; BARTOLOME, J. A.; ARTECHE, A. C. M.; PANCARCI, S. M.; THATCHER, W. W. Reproductive responses following postpartum suppression of follicular development with a Deslorelin implant during summer heat stress. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 52, Abstract, 2003

SILVESTRE, F.T.; BARTOLOME, J.A.; KAMIMURA, S.; ARTECHE, A.C.; PANCARCI, S.M.; TRIGG, T.; TATCHER, W.W. Postpartum suppression of ovarian activity with a deslorelin implant enhanced uterine involution in lactating dairy cows. *Animal Reproduction of Science*, v. 110, p. 79-95, 2009a.

SILVESTRE, F.T.; KAMIMURA, S.; ARTECHE, A.C.; BARTOLOME, J.; PANCARCI, S.M.; THATCHER, W.W. Reproductive responses following postpartum suppression of ovarian follicular development with a deslorelin implant during summer heat stress in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 320–337, 2009b.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblastic 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.

STANISLAUS, D.; PINTER, J.H.; JANOVICH, J.A.; CONN, P.M. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotrofin-releasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.144, n.1, p. 1-10, 1998.

STUMPF, T. T.; DAY, M. L.; STOTTS, J. A.; WOLFE, M. W.; PENNEL, P. L.; KITTOCK, R. L.; KINDER, J. E. Effect of oestradiol on luteinizing hormone secretion

during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.41, p. 91-99, 1989.

USDA (United States Department of Agriculture). [www.usda.gov](http://www.usda.gov). Acesso em: 21 de junho de 2012.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p. 172-189, 2003.

VASCONCELOS, J.L.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, v. 60, n. 5, p. 795-807, 2003.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; CAMPBELL, B.K.; HUNTER, M.G. Intraovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*, v.68, p.S22-S29, 2007.

WILLIAMS, G.L. Fisiologia e manejo reprodutivo de vacas de corte pós-parto. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 9, 2005, Uberlândia, MG. *Anais...* Uberlândia: CONAPEC, 2005. p.195-203.

WILTBANK, M.C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21–52, 2002.

WILTBANK, M.C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M.M.; VASCONCELOS, J.L.M.; NASCIMENTO, A.B.; SOUZA A.H.; AYRES, H.; CUNHA, A.P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J.N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*. v.76, p. 1568–1582, 2011.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25-55, 2000b.

## **TABALHO CIENTÍFICO**

Trabalho enviado para o periódico “**Veterinária e Zootecnia**”

Normas para publicação disponível em :

<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/about/submissions#onlineSubmissions>

### **AÇÕES DO INTERFERON-TAU DURANTE O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS**

**ACTIONS OF INTERFERON-TAU DURING MATERNAL RECOGNITION OF  
PREGNANCY IN CATTLE**

**ACCIONES DE INTERFERON-TAU DURANTE RECONOCIMIENTO  
MATERNAL DE LA PREÑEZ EN EL GANADO**

**Flavia Caroline Destro<sup>1</sup>**

**Eduardo Trevisol<sup>2</sup>**

**João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>3</sup>**

---

<sup>1</sup> Aluna de Mestrado Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Distrito de Rubião Júnior. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Autora para correspondência: krol.destro@gmail.com

<sup>2</sup> Aluno de Doutorado do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Bolsista FAPESP. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

## AÇÕES DO INTERFERON-TAU DURANTE O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS

### RESUMO

O reconhecimento materno da gestação é o processo pelo qual o concepto sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do corpo lúteo (CL), com posterior manutenção da gestação. Esse processo ocorre entre os dias 15 e 19 pós-fertilização, e estabelece um dos principais desafios biológicos para a obtenção de índices reprodutivos satisfatórios em bovinos. Nesta espécie, uma glicoproteína denominada Interferon-tau (IFN- $\tau$ ), secretada pelo concepto no ambiente uterino, age de forma parácrina inibindo a expressão dos receptores de estrógenos (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no endométrio, evitando a liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ), hormônio responsável pelo início da luteólise. O IFN- $\tau$  também aumenta a expressão de vários genes estimulados por interferons (ISGs) no útero, CL e em células sanguíneas. A ação endócrina direta do IFN- $\tau$  em tecidos extrauterinos estimula a expressão de ISGs, que no CL, podem estar envolvidos com a resistência luteal à ação luteolítica da PGF2 $\alpha$ . Portanto, esta revisão tem como objetivo apontar como ocorre o mecanismo de luteólise na espécie bovina, e a atuação parácrina e principalmente endócrina do IFN- $\tau$ , durante o período de reconhecimento materno da gestação.

Palavras-chave: Luteólise, reconhecimento materno da gestação, Interferon-tau, ação parácrina, ação endócrina.

## ACTIONS OF INTERFERON-TAU DURING MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN CATTLE

### ABSTRACT

Maternal recognition of pregnancy is the process by which the conceptus signals its presence to the maternal unit, increasing the life of the corpus luteum (CL) and

---

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970, Botucatu/SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univ Estadual Paulista, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

keeping pregnancy. This mechanism occurs between 15 and 19 after fertilization, and establishes a major biological challenge to obtain satisfactory reproductive rate in cattle. In this species, the glycoprotein called interferon-tau (IFN- $\tau$ ), secreted by the conceptus in the uterine environment, acts by inhibiting the expression of paracrine estrogen receptor (ESR1) and oxytocin (OXTR) in the endometrium, preventing the release of pulses luteolytic of prostaglandin F2 alpha (PGF2a), hormone responsible for the beginning of luteolysis. IFN- $\tau$  also increases the expression of several genes stimulated by interferons (ISGs) in the uterus, CL and blood cells. The direct endocrine action of IFN- $\tau$  in tissues extrauterinos stimulates the expression of ISGs that at CL may be involved with luteal resistance to the luteolytic action of PGF2a. Therefore, this review aims to point out how occurs the mechanism of luteolysis in the bovine species, and the performance paracrine and mainly endocrine of IFN- $\tau$  during the period of maternal recognition of pregnancy.

Key-words: Maternal recognition of pregnancy luteolysis, interferon-tau, paracrine activity, endocrine action.

## ACCIONES DE INTERFERON-TAU DURANTE RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LAPREÑEZ EN EL GANADO

### RESUMEN

El reconocimiento materno de la gestación es el proceso por lo cual el conceptus señala su presencia a la unidad materna, lo que prolonga la vida del cuerpo lúteo (CL) y mantiene la gestación. Ese mecanismo ocurre entre los días 15 y 19 después de la fertilización, y establece un de los principales desafíos biológicos para que se obtenga índices reproductivos satisfactorios en bovinos. En esta especie, una glicoproteína denominada Interferon-tau (IFN- $\tau$ ), secretada por el concepto en el ambiente uterino, actúa de manera parácrina inhibiendo la expresión de los receptores de estrógenos (ESR1) y de ocitocina (OXTR) en el endometrio, evitando la liberación de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ), hormona responsable por el inicio de la luteolisis. El IFN- $\tau$  también aumenta la expresión de varios genes estimulados por interferons (ISGs) en el útero, CL y en células sanguíneas. La acción endócrina directa del IFN- $\tau$  en tejidos extrauterinos estimula la expresión de ISGs, que

en lo CL, pueden estar envueltos con la resistencia luteal a la acción luteolítica de la PGF2 $\alpha$ . Por lo tanto, esta revisión tiene como objetivo apuntar como ocurre el mecanismo de luteólisis en la especie bovina, y la actuación parácrina y principalmente endócrina del IFN- $\tau$ , durante el periodo de reconocimiento materno de la gestación.

Palabras-claves: luteólisis, reconocimiento materno de la gestación, interferon-tau, acción parácrina, acción endócrina.

## INTRODUÇÃO

A espécie bovina (*Bos taurus*) foi domesticada e selecionada, constituindo importante fonte de proteína animal para a população humana. Com o crescimento populacional há a necessidade de maximizar a eficiência dos processos produtivos para que as demandas por alimento da sociedade moderna sejam supridas. Neste cenário, o Brasil apresenta-se em destaque, terminando 2010 como o portador do maior rebanho de gado no mundo para fins comerciais, estimado em 185,1 milhões de cabeças de gado segundo dados da USDA (1, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos).

A bovinocultura é altamente influenciada pelos índices reprodutivos das fêmeas, as quais devem apresentar idealmente intervalo entre partos (IEP), ao redor de 12 meses. Porém o Brasil apresenta um IEP de aproximadamente, 17 meses e consequentemente, produz de 0,7 bezerro/ano. Como o país possui cerca de 57 milhões de fêmeas bovinas de raças de corte em idade reprodutiva temos o nascimento anual de 40 milhões de bezerros (2).

O reconhecimento materno da gestação é o período em que o concepto sinaliza sua presença para a unidade materna. Em ruminantes, este fenômeno ocorre conjuntamente com o alongamento do embrião, que está positivamente associado com a produção de IFN- $\tau$ , que é uma citocina secretada em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do concepto de ruminantes antes da implantação embrionária (3).

O IFN- $\tau$  é classificado como interferon do tipo I e sua principal função é evitar o retorno à ciclicidade devido o bloqueio da luteólise e preservação do funcionamento do CL (4). O desenvolvimento comprometido do embrião e subdesenvolvimento da trofotoderma provocam a indesejável luteólise prematura, inviabilizando a gestação (5, 3).

O IFN- $\tau$  atua de forma parácrina no útero, inibindo a expressão ESR1 e dos OXTR no endométrio, evitando os pulsos luteolíticos de PGF $_{2\alpha}$  (6). O IFN- $\tau$  liga-se a receptores de IFN tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) com sinalização via Jak/ STAT (7). Ainda há a indução da expressão de vários ISGs no útero, e em células sanguíneas (8, 9). Trabalhos recentes citam a expressão dos ISGs no CL e em outros tecidos extrauterinos durante o início da prenhez em ovelhas, sugerindo que além da ação parácrina já elucidada, o IFN- $\tau$  possui ação endócrina durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes (10).

Diante da evidente importância econômica da bovinocultura no Brasil e das perdas financeiras carregadas pelas falhas reprodutivas, no que diz respeito ao não bloqueio da luteólise, torna-se necessário cada vez mais o conhecimento da fisiologia parácrina e endócrinas envolvidas durante reconhecimento materno da gestação. Portanto, esta revisão tem como objetivo apontar como ocorre o desencadeamento da luteólise na espécie bovina, e a atuação parácrina e principalmente endócrina do IFN- $\tau$  durante o período de reconhecimento materno da gestação.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Mecanismo de liberação da PGF $_{2\alpha}$**

Após a ovulação do folículo dominante, há a formação de uma glândula temporária chamada de corpo lúteo (CL) tendo como sua secreção a progesterona (P4), necessário para a ciclicidade ovariana e o estabelecimento e manutenção da gestação na maioria dos mamíferos (11, 12, 13, 3). Na espécie ovina foi isolada e identificada dois tipos celulares, as células grandes e as células pequenas, que podem ser identificadas mediante características morfológicas e bioquímicas (14). As células luteais grandes secretam aproximadamente sete vezes mais P4, quando comparadas com as pequenas células do CL (15).

Chegando ao fim da fase progesterônica ou luteal, a P4 causa inibição de seus próprios receptores, permitindo um retorno da ação central do hipotálamo pelo estrógeno, e de modo periférico, no útero (11), levando a um ligeiro aumento na expressão de ESR1 (6). Os estrógenos são os que determinam o aumento da expressão de OXTR no endométrio e a liberação de ocitocina (OCT) pela neurohipófise (6). Com a ligação da OCT ao seu receptor, há a estimulação da síntese e secreção de PGF $_{2\alpha}$  responsável pelo início da luteólise (17).

Nas espécies bovina, ovina e suína, a artéria ovariana está intimamente posicionada à veia útero ovariana, mas, somente na vaca e na ovelha, a área de contato está aumentada em função de a artéria apresentar um tortuoso caminho sobre a veia. A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produzida pelo útero é transferida para os ovários pelo mecanismo de contra corrente estabelecido entre a veia uterina e a artéria ovariana (18).

Em várias espécies já foram descritas a produção de prostaglandinas pelo CL (11,12,13) sugerindo o funcionamento de um sistema luteal de metabolismo, transporte e sinalização de  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , indicando que as prostaglandinas de origem luteal possam contribuir para a autorregulação do CL (19,20). A estimulação luteal pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aumenta a liberação de OCT luteal (21), que potencializa a liberação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina (17) e luteal (22).

Estudos realizados com CL de bovinos demonstraram a presença de receptores de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (PGR), em pequena quantidade em células endoteliais e células luteais pequenas, ao contrário das células luteais grandes, nas quais esses receptores são abundantes (23). A resposta luteal à  $\text{PGF}_{2\alpha}$  é a diminuição da síntese de  $\text{P}_4$ , pela diminuição da captação e do transporte de colesterol celular e pela diminuição da expressão de enzimas esteroidogênicas (12).

Para que ocorra o bloqueio de todo o mecanismo luteolítico, o  $\text{IFN-}\tau$  produzido pelo embrião entre os dias 14-19 do ciclo estral, age no útero inibindo a transcrição do gene  $\text{ESR1}$  e do gene  $\text{OXTR}$ , anulando os pulsos luteolíticos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (17). A hipótese segundo Spencer et al. (2007) é de que o efeito antiluteolítico do  $\text{IFN-}\tau$  silencia a transcrição gênica para  $\text{ESR1}$  no útero, com consequente “downregulation” no PGR, impedindo a expressão gênica de  $\text{OXTR}$  e liberação uterina de OCT, induzida pela  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

### **Reconhecimento Materno da Gestação**

A expressão “reconhecimento materno da gestação” foi definida por Roger Short (24), como o processo pelo qual o conceito sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do CL e mantendo a gestação, devido a um diálogo bioquímico que se estabelece entre o conceito e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (25).

Esse processo ocorre devido a liberação de  $\text{IFN-}\tau$  pelo embrião entre os dias 16 e 23 de gestação na vaca e na cabra, 12 e 21 dias na ovelha, e o aumento da síntese dessa citocina ocorre no período de alongamento do embrião (26).

Em ruminantes, a transformação do CL cíclico em CL gestacional é assegurada por intervenção do embrião, que bloqueia a ação luteolítica do útero inibindo a secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e mantém a ação luteotrófica do hormônio luteinizante (LH), necessária ao seu desenvolvimento. Embriões subdesenvolvidos que não se alongaram suficientemente possuem uma menor capacidade de bloquear a luteólise e apresentam menores chances de sobrevivência. A falha no alongamento do embrião pode ser devido a fatores como retardo no desenvolvimento, anormalidades cromossômicas, anormalidades no meio ambiente uterino. A incapacidade de alguns embriões em bloquear a luteólise no período considerado crítico, compreendido entre os dias 17 e 19 da gestação, pode levar ao retorno à ciclicidade ovariana (27).

O  $\text{IFN-}\tau$  age via parácrina no útero inibindo a expressão dos ESR1 e de OXTR do endométrio, evitando, assim, a liberação de pulsos luteolíticos  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , hormônio responsável pelo início da luteólise. Além da sua ação durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes, o  $\text{IFN-}\tau$  aumenta a expressão de ISGs no útero, no CL e em células sanguíneas (10).

### **Interferon Tau**

A denominação de interferons surgiu com estudos de Stewart (28), que os nomeou por sua peculiar capacidade de interferir na biologia das células mamíferas induzindo um estado antiviral. Os IFNs são citocinas sintetizadas e secretadas por células somáticas das espécies mamíferas.

Alguns estudos identificaram diversas proteínas tipo IFN inicialmente em humanos. Na espécie bovina, foram identificados múltiplos subtipos de  $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\beta$ ,  $\text{IFN-}\omega$ , e ainda se observou a expressão de  $\text{IFN-}\tau$ , (29,30). Apesar das diferenças na sequência de aminoácidos, esses IFNs apresentam estrutura tridimensional semelhante, e designou-se coletivamente como IFNs do tipo I (29,30,31).

Em experimentos realizados nos anos 60, evidenciou-se que a manutenção do CL em ovinos ocorre pela atuação de fatores produzidos pelo concepto no endométrio materno (32,33). Posteriormente, no início da década de 80, foi purificada uma proteína secretada pelo concepto ovino com características de uma antiluteolisina. Essa proteína, inicialmente chamada de proteína X, e posteriormente denominada trofoblastina ovina (oTP-1), era o principal produto de conceptos ovinos em cultura, sendo secretada em maior abundância entre os dias 10 e 12 da prenhez (34,35).

Subsequentemente, essa proteína teve sua função antiluteolítica comprovada e associada ao reconhecimento materno da gestação. Após seu sequenciamento (36), foi renomeada IFN- $\tau$  devido à sua semelhança estrutural com os IFNs tipo I (29,30). Essa associação despertou muito interesse, pois além das funções antivirais e imunomoduladoras conhecidas dos IFNs, essa proteína possuía ação no contexto reprodutivo (3).

Assim como todos IFN tipo I, o IFN- $\tau$  se liga às duas subunidades que compõem o receptor (IFNR1 e IFNR2) e são expressos em todos os tecidos corporais, inclusive no útero, tendo como principais funções mediar respostas antivirais e maternas em função do IFN- $\tau$  produzido pelo concepto (37).

### **Mecanismos de ação do IFN- $\tau$**

O IFN- $\tau$  se liga as duas subunidades do seu receptor para exercer sua ação pela via de transdução de sinais Jak/STAT e também pelas vias PI3K e Akt, onde as proteínas tirosino-quinases fosforilam proteínas STAT formando complexos multiméricos que agem como fatores de transcrição, induzindo a expressão de diversos genes (38,39,40,41,42).

A expressão do gene do IFN- $\tau$  foi expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*, e sua programação genética parece ser independente do ambiente uterino. Porém, a produção de IFN- $\tau$  é influenciada pelo ambiente uterino, já que sua produção *in vitro* aumenta na presença de tecido uterino (43). Existem Alguns fatores de transcrição que são importantes na regulação da expressão do gene do IFN- $\tau$ , dentre eles o fator de transcrição Ets2, que possui um papel fundamental durante o início da gestação (44). Após a implantação embrionária, onde ocorre o contato do trofoblasto com o endométrio, a expressão de IFN- $\tau$  é cessada por completo (45).

O IFN- $\tau$  silencia a regulação ESR1 ovino (46,47) e, conseqüentemente o OXTR (6,41) no endométrio. A diminuição da transcrição do OXTR provavelmente é devido a diminuição na ESR1 causada pelo IFN- $\tau$ , já que o OXTR não é diretamente regulado pelo IFN- $\tau$  (47). A supressão do ESR1 e OXTR causa alteração (ovelhas) (48,49) ou atenuação (vacas) dos pulsos luteolíticos de PGF2 $\alpha$ , baseado na detecção da PGFM (50).

### **Ação parácrina do IFN- $\tau$**

A produção de IFN- $\tau$  pelo concepto é liberada no lúmen uterino. A sua molécula liga-se ao IFNR1 e IFNR2, localizados no lúmen uterino, dando início a cascata de sinalização Jak/STAT formando o fator de transcrição ISGF3 e translocado ao núcleo da célula. A ação do ISGF3 está na inibição da transcrição do ESR1 e, consequentemente OXTR. Assim, o OXTR não é inserido na membrana celular (3).

A falta de sinalização da OCT ao seu receptor altera a cascata de síntese de prostaglandinas, modificando o padrão de síntese e liberação da PGF $_{2\alpha}$  e inibindo a lise do CL. Uma segunda ação do fator de transcrição ISGF3 se dá na ligação à região responsiva a estímulos de IFNs (ISRE) iniciando a síntese de ISGs (3).

### **Ação endócrina do IFN- $\tau$**

Várias hipóteses têm sido estudadas a fim de compreender a ação endócrina do IFN- $\tau$  durante o reconhecimento materno da gestação. Em um trabalho feito por Asselin e Fortier (51), especulou-se que o IFN- $\tau$  possa inibir a luteólise, alterando a produção de PGF $_{2\alpha}$  luteolítica para PGE, que supostamente é considerada luteotrófica. Foi observado que o IFN- $\tau$  regula negativamente a expressão das enzimas prostaglandina F $_2$  sintetase e prostaglandina 9-ceto-redutase. Desta forma, possivelmente previne a produção de PGF $_{2\alpha}$  endometrial.

Antoniazzi et al. (3), avaliaram se ocorria a expressão de ISG15 (um subtipo dos ISGs, provavelmente envolvido no reconhecimento materno), no dia 15 do ciclo estral ou no início da gestação, em linfonodos que drenam o útero (ilíacos) e a cabeça (submandibulares). Uma segunda hipótese sugerida foi que o IFN- $\tau$  poderia deixar o útero utilizando a via linfática. Para testar essa última, seria esperado que no dia 15 da gestação, os linfonodos ilíacos apresentassem uma maior expressão de ISG15 quando comparados com os submandibulares. Entretanto, nenhuma diferença foi observada. Esses resultados indicam que o IFN- $\tau$  não utiliza via linfática para atingir a circulação sistêmica (3).

O IFN- $\tau$  liberado via endócrina para a veia uterina aumenta a resposta antiviral periférica e as células imunes, que quando são expostas a uma infecção viral, imediatamente respondem e protegem a gestação. Uma segunda ação endócrina do IFN- $\tau$  durante o início da gestação é sugerido através da indução dos ISGs no CL, que contribui para a resistência luteal a PGF $_{2\alpha}$  (52).

Trabalhos atuais estudaram a expressão de ISG15 em tecidos extrauterinos durante o início da gestação em ovinos (10, 53). Observou-se uma maior expressão de ISG15 em células luteais grandes no dia 15 da gestação, quando comparada com a expressão em células luteais grandes de ovelhas não prenhes. Por meio de um ensaio antiviral, foram observadas no dia 15 da gestação bioatividades maiores de IFNs tipo I no sangue da veia uterina, quando comparadas as no sangue da artéria uterina e veia jugular (10).

Deste modo, foi realizado outro ensaio antiviral, utilizando soro da veia uterina de ovelhas gestantes no dia 15, comparando-o com animais no dia 15 do ciclo estral. Neste ensaio, as amostras dos animais no dia 15 do ciclo estral foram avaliadas sem tratamento e com adição de roIFN- $\tau$  (IFN- $\tau$  recombinante ovino). De modo semelhante, nesse mesmo experimento as amostras dos animais prenhes no dia 15 também foram avaliadas sem tratamento e com adição de anticorpo anti-IFN- $\tau$  (53).

Os resultados demonstraram baixa atividade antiviral no soro não tratado de animais não prenhes e alta atividade quando foi adicionado roIFN- $\tau$ . Já as amostras dos animais prenhes não tratadas apresentaram alta atividade antiviral, que desapareceu quando o soro foi tratado com anticorpo anti-IFN- $\tau$ . Concluiu-se que o IFN presente no soro da veia uterina de animais prenhes no dia 15 da gestação era o IFN- $\tau$ , uma vez que sua atividade antiviral foi bloqueada com a utilização de anticorpo específico contra IFN- $\tau$  (53).

Após a comprovação da presença de IFN- $\tau$  na veia uterina, deu-se início a investigação de sua ação em tecidos extrauterinos que poderiam estar envolvidos com o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. Com isso, um novo modelo de estudo da ação endócrina do IFN- $\tau$  foi desenvolvido. Primeiramente, dois diferentes métodos foram testados; o primeiro envolveu uma única injeção de roIFN- $\tau$  na artéria ovariana e o segundo a instalação de uma bomba osmótica para infusão contínua de roIFN- $\tau$  na veia uterina (53)

Os dois métodos induziram a expressão de ISGs no CL. Contudo, a infusão contínua de roIFN- $\tau$  na veia uterina resultou em maior expressão de ISG15 luteal quando comparada a injeção única na artéria ovariana. Resultados de um experimento demonstraram que, iniciando dia 10 do ciclo estral, a infusão contínua de roIFN- $\tau$  na veia uterina prolongava o intervalo entre estros por mais de 32 dias. As ovelhas tratadas com IFN- $\tau$ , além de não apresentarem cio, foram capazes de manter as concentrações de P<sub>4</sub> sérica elevadas até 32 dias pós-cio (53).

## CONCLUSÃO

Novos estudos ainda devem ser realizados na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da gestação, especialmente no que se refere a função endócrina do IFN- $\tau$ . Essa ação soma-se a sua conhecida função parácrina, adicionando assim, outra importante variável ao mecanismo. Os dados e resultados de alguns trabalhos sugerem que a função endócrina do IFN- $\tau$  pode estar diretamente ligada com a expressão dos ISGs, que interferem parcial ou totalmente a resistência do CL à ação da PGF2 $\alpha$ , que é importantíssima no mecanismo de reconhecimento materno da gestação. É necessário cada vez mais de estudos a fim de compreender o complexo mecanismo de ação do IFN- $\tau$  em tecidos extrauterinos, como o CL que pode estar direta ou indiretamente (ação de ISGs) envolvidos com o bloqueio da luteólise em ruminantes em bovinos.

Portanto, as atuais ferramentas de pesquisa devem trazer novas perspectivas ao estudo dos mecanismos determinantes ao êxito do processo reprodutivo.

## REFERÊNCIAS

- 1-USDA, 2010. Avaliable from:<<http://www.usdabrazil.org.br/home/index.asp>> Acessado em 29.08.2011.
- 2-ANUALPEC 2008. ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA 2008. IFNP E AGRAFP, SÃO PAULO: IFNP.
- 3-Antoniuzzi AQ, Henkes LE, Oliveira JFC, Hansen TR. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. Ciênc. Rural. 2011;41:176-185.
4. Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. Semin Cell Dev Biol. 2008; 19:170-177.

5-Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Ani Repro Sci.* 2004;82:513–535.

6-Spencer TE, Bazer FW. 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.* 1996;53:1527-1543.

7-Binelli M, THATCHER WW, MATTOS R, BARUSELLI PS.. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Therio.* 2001;56:1451-1463.

8-Yankey SJ, KG, AM, SJ, K, et al. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, nonpregnant ewes. *J Endocrinol.* 2001;170:R7-R11.

9- Han H, KJ, LA, TR. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol.* 2006;191:505-512.

10-Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Rao DN, et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep in the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology.* 2008;149:1252-1259.

11-McCracken JA, Custer E, Lams JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 1999;79:263-323.

12-Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000;80:1-29.

13-Davis JS, Rueda BR. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2002;7:1949-1978.

- 14-Niswender GD, Schwall RH, Fitz TA, Farin CE, Sawyer HR. Regulation of luteal function in domestic ruminants: New concepts. *Rec. Prog. Horm. Res.* 1985; 41: 101-151.
- 15-Kenny N, Farin CE, Niswender GD. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. *Biol Reprod.* 1989;40:191-196.
- 16-Spencer TE, Bazer FW. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology.* 1996;137:1144-1147.
- 17-Wathes DC, Lamming GE. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:53-67.
- 18-Ginther OJ. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J Anim Sci.* 1974;39:550-564.
- 19-Hayashi K, Acosta TJ, Berisha B, Kobayashi S, Ohtani M, Schams D, et al. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003;70:339-349.
- 20-Arosh JA, Banu Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier J. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, v.145, n.5, p.2551-2560, 2004.
- 21-Flint APF, Sheldrick EL. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature.* 1982;297:587-588.
- 22-Shirasuna K, Shimizu T, Hayashi K, 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.* 2007;76:965-970.

23-Fukui H, Fujimoto K, Mizuguchi H, Sakamoto K, Horio Y, Takai S, et al. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2 alpha receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:3881-3886.

24-Short RV. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy; 1969, London; 1969. p. 2–26.

25- Spencer TE, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 2004;2: 49.

26-Geisert RD, Zavy MT, Biggers BG, Garret JE, Wettermann RP. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Anim Reprod Sci.* 1988;16:11-25.

27-Salles MGF, Araújo AA. Corpo lúteo cíclico e gestacional: Revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2010;34:185-194.

28-Stewart WE. The interferon system. New York: Springer-Verlag, 1979.

29-Roberts, RM, Leamen DW, Cross JC. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1992;200:7-18.

30-Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. Trophoblast interferons. *Placenta.* 1999; 20:259-264.

31-Mogensen, KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G. The type I interferon receptor: structure, function and evolution of a family business. *Journal of Interferon Cytokine Research.* 1999;19:1069.

32-Moor RM, Rowson LEA. Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep. *Nature.* 1964;210:522-523.

33-Moor RM, Rowson LEA. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *Jou Endocrinol* 1966;34:233-239.

34-Godkin JD, Bazer FW, Session F, Roberts RM. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at days 13-21. *J Reprod Fertil*. 1982;71:57-64.

35-Godkin JD, Bazer FW, Roberts RM. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*. 1984;114:120-130.

36-Imakawa K, Russell VA, Mohammad K, Keith R M, Polites HG, Roberts RM. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*. 1987;330:377-379.

37-Rosenfeld CS, Han C, Alexenko AP, Spencer TE, Roberts RM. Expression of Interferon Receptor Subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the Ovine Uterus. *Biol Reprod*. 2002;67:847–853.

38-Ott TL, Yin J, Wiley AA, Kim HT, Gerami-naini B, Spencer T.E, et al. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*. 1998;59:784-794.

39-Spencer TE, Ott TL, Bazer FW. Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: effects of pregnancy and ovine interferon tau. *Biol Reprod*. 1998;58:1154-1162.

40-Kim S, Choi Y, Bazer FW, Spencer TE. Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon- $\tau$  independent of signal transducer and activator of transcription. *Endocrinology*. 2003;144:5203-5212.

41-Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, et al. Effect of administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*. 2006;147:2127-2137.

- 42-Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi, Y, Farmer JL, Adelson DL, et al. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon-tau in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 2006;74:383-394.
- 43-Kerbler TL, Buhr, MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Therio*, 1997;47:703- 714.
- 44-Ezashi T, Ealy AD, Ostrowsky MC, Roberts RM. Control of interferon-tau gene expression by Ets-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:7882-7887.
- 45-Demmers KJ, Derecka Flint A .Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction.* 2001;121:41-49.
- 46-Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. Ovine interferon- $\tau$  inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology.* 1995;136:4932-4944.
- 47-Fleming JG, Spencer TE, Safe SH, Bazer FW. Estrogen Regulates Transcription of the Ovine Oxytocin Receptor Gene through GC-Rich SP1 Promoter Elements. *Endocrinology.* 2006;147:899-911.
- 48-Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H, Bradford GE. Release of prostaglandin F-2a and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1988a; 83:517-26.
- 49-Zarco L, Stabenfeldt GH, Basu S, Bradford GE, Kindahl H. Modification of prostaglandin F-2a synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1988b;83:7-36.

50-Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, et al. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha of cows in response to recombinant interferon-tau. J. Dairy Sci. 1995; 78:1921-1931.

51-Asselin E, Fortier MA. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. Biol Reprod. 2000;62:125-131.

52-Hansen TR, Henkes LK, Ashley RL, Bott RC, Antoniazzi AQ, Han H. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. In: VII Reproduction in domestic ruminants; 2010, Anorage. Anorage: Society of reproduction and fertility; 2010.

53-Bott, RC, Ashley RL, Henkes LE, Antoniazzi AQ, Bruemmer JE, Niswender GD, et al. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. Biol Reprod. 2010;82:725-735.

54-Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. Reprod Fertil Develop, 2007;19:65–78.