

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PÓS-OVULATÓRIA DE
PROGESTERONA NAS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE
VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS À IATF E NOVILHAS
CRUZADAS SUBMETIDAS À TETF**

Marcelo Carnelli Frade

Médico Veterinário

ARAÇATUBA - SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PÓS-OVULATÓRIA DE
PROGESTERONA NAS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE
VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS À IATF E NOVILHAS
CRUZADAS SUBMETIDAS À TETF**

Marcelo Carnelli Frade

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária-UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA - SP

2012

F799e

Frade, Marcelo Carnelli.

Efeito da concentração pós-ovulatória de progesterona nas taxas de concepção de vacas zebuínas submetidas à IATF e novilhas

cruzadas submetidas à TETF / Marcelo Carnelli Frade. –

Araçatuba: [s.n.], 2012.

74f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba. Araçatuba, SP. 2012.

Bibliografia.

1. Progesterona. 2. Corpo lúteo. 3. Gonadotrofinas corionicas. 4. Bovino – Reprodução. I. Título.

CDD 22.ed. 636.208926

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO CARNELLI FRADE - Nascido em 28 de setembro de 1978, na cidade de Vitória, no estado do Espírito Santo. Formado em Medicina Veterinária, pela Faculdade de Castelo – FACASTELO, na cidade de Castelo - ES, em 2005. Realizou Residência Médica Veterinária pela UNESP de Araçatuba na área de Reprodução Animal, em 2006 e 2007. Possui conhecimentos práticos na área de inseminação artificial, produção *in vitro* e transferência de embriões bovinos.

*“Trabalhe como se tudo dependesse de Ti
e confie como se tudo dependesse de Deus”*

(Santo Inácio de Loyola)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem ele não teria sido possível a finalização do Mestrado.

Aos meus pais Francisco e Terêsa, aos meus irmãos André e Flávio e a minha sobrinha Ana Beatriz.

Em especial a minha esposa Camila e minha filha Luísa, que de maneira muito especial contribuíram para realização de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus amigos, pelo apoio, motivação e alegrias.

Dedico àqueles que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pela oportunidade concedida e por tornar possível esta conquista.

A Profa. Dra. Juliana Peiró, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pela compreensão e paciência.

A Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, pela orientação e confiança.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mario Binelli, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela grandiosa contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pela contribuição na realização das mensurações de progesterona.

Ao Dr. Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, Pólo Extremo Oeste, pelo auxílio na condução de parte dos experimentos.

Ao Doutorando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Manoel Sá Filho, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

A grandiosa Devani Mariano Pinheiro, do Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP de Araçatuba, pela realização de todas as dosagens hormonais realizadas no presente estudo.

As Graduandas do Curso de Zootecnia da UNESP de Dracena, Milene Gondim de Oliveira Alves e Manuella Santana da Piedade João, pelo auxílio na realização de parte dos experimentos.

A Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, Pólo Extremo Oeste, em especial à Fazenda Experimental de Andradina-SP, pela concessão de parte dos animais utilizados neste estudo.

A COMAPI Agropecuária, por ter possibilitado a utilização das novilhas cruzadas como receptoras de embriões no referido projeto.

Aos colegas veterinários Ricardo Heitor Brenner e Mariana Brenner, pelo tempo despendido, preocupação e atenção.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pela cordialidade e colaboração.

Aos funcionários da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, Pólo Extremo Oeste, em especial à Fazenda Experimental de Andradina-SP, pelo grande auxílio no manejo dos animais.

Aos funcionários da COMAPI Agropecuária, em especial ao gerente Fredson Lucas, por fornecer parte dos animais utilizados no referido experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Agradeço àqueles que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Eficiência reprodutiva em rebanhos bovinos de corte.....	11
2.2 Mortalidade embrionária precoce.....	12
2.3 Mecanismos endócrinos de ação da progesterona.....	14
2.4 Mecanismos moleculares de ação da progesterona.....	16
2.5 Efeito das concentrações plasmáticas de progesterona nas taxas de concepção.....	18
3. HIPÓTESE.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1 Experimento 1	
5.1.1 Local do Experimento.....	21
5.1.2 Animais.....	22
5.1.3 Sincronização dos estros e das ovulações.....	22
5.1.4 Coleta de sangue e processamento de amostras.....	22
5.1.5 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona.....	23
5.1.6 Diagnóstico de gestação.....	23
5.1.7 Análise estatística.....	23
5.2 Experimento 2	
5.2.1 Local do Experimento.....	26
5.2.2 Animais.....	26
5.2.3 Sincronização dos estros e da ovulação.....	26
5.2.4 Coleta de sangue e processamento de amostras.....	27
5.2.5 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona.....	27

5.2.6 Diagnóstico de gestação.....	27
5.2.7 Análise estatística.....	28
5.3 Experimento 3	
5.3.1 Local do Experimento.....	30
5.3.2 Animais.....	30
5.3.3 Sincronização dos estros e das ovulações no protocolo de TETF.....	31
5.3.4 Aspiração das fêmeas doadoras de oócitos.....	32
5.3.5 Produção <i>in vitro</i> dos embriões.....	33
5.3.6 Avaliação do corpo lúteo por ultrassonografia.....	34
5.3.7 Transferência de embriões em tempo fixo.....	34
5.3.8 Coleta de sangue e processamento de amostras.....	34
5.3.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona.....	35
5.3.10 Diagnóstico de gestação.....	35
5.3.11 Análise estatística.....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.1 EXPERIMENTO 1.....	38
6.2 EXPERIMENTO 2.....	49
6.3 EXPERIMENTO 3.....	54
7. CONCLUSÕES.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui replicata, eCG, prenhez, interação eCG*pregnhez e interação replicata*pregnhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 1.....	25
Tabela 2. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui replicata, prenhez e a interação replicata*pregnhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 2.....	29
Tabela 3. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui presença de estro, replicata, prenhez e a interação replicata*pregnhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 3.....	37
Tabela 4. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada - Experimento 1.....	39
Tabela 5. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas prenhes (n=45) ou não prenhes (n=82), tratadas com 0UI ou 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada -	

Experimento 1.....	45
--------------------	----

Tabela 6. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) ou prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada -

Experimento 2.....	51
--------------------	----

Tabela 7. Média e erro padrão da área do corpo lúteo no D5 (cm²) e concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas segundo a ausência (n=66) ou presença de estro (n=170), dados apresentados da forma não transformada -

Experimento 3.....	55
--------------------	----

Tabela 8. Média e erro padrão da área do corpo lúteo no D5 (cm²) e concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas segundo a condição de não prenhe (n=99) ou prenhe (n=137), dados apresentados da forma não transformada -

Experimento 3.....	59
--------------------	----

Tabela 9. Número de receptoras, concentração de P4 no D7, taxa de prenhez e risco ajustado (intervalo de confiança) para os quartis Q1, Q2, Q3 e Q4 e valor de p em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300UI na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, concentração de P4 no D7 apresentada da forma não transformada - Experimento 3.....

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Protocolo dos procedimentos de sincronização dos estros e das ovulações, observações de estros, mensuração do CL, coletas de sangue e diagnóstico de gestação realizados no Experimento 3.....	32
Figura 2. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D0, D3, D5, D7 e D10 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1.....	40
Figura 3. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (DIF 5-3), D7 e D3 (DIF 7-3), D10 e D3 (DIF 10-3), D7 e D5 (DIF 7-5), D10 e D5 (DIF 10-5) e o D10 e D7 (DIF10-7), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1.....	41
Figura 4. Razões médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (D5 / D3), D7 e D3 (D7 / D3), D10 e D3 (D10 / D3) e D7 e D5 (D7 / D5), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1.....	42

Figura 5. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D0, D3, D5, D7 e D10 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1..... 46

Figura 6. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (DIF 5-3), D7 e D3 (DIF 7-3), D10 e D3 (DIF 10-3), D7 e D5 (DIF 7-5), D10 e D5 (DIF 10-5) e o D10 e D7 (DIF10-7), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1..... 47

Figura 7. Razões médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (D5 / D3), D7 e D3 (D7 / D3), D10 e D3 (D10 / D3) e D7 e D5 (D7 / D5), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1..... 48

Figura 8. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D3, D5, D7, D12 e D17 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) e prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 2..... 52

Figura 9. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (5-3), D7 e D3

(7-3), D12 e D3 (12-3), D7 e D5 (7-5), D12 e D5 (12-5), D12 e D7 (DIF12-7) e D17 e D12 (17-12), sendo o D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) e prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 2..... 53

Figura 10. Valores médios e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D5, D7, a diferença entre D7 e D5 (D7-D5) e a razão entre D7 e D5 (D7 / D5), considerando D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras de embriões que tiveram ausência (n=66) ou presença (n=170) de estro..... 56

Figura 11. Valores médios e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D5, D7, a diferença entre D7 e D5 (D7-D5) e a razão entre D7 e D5 (D7 / D5), considerando D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras de embriões prenhe (n=137) e não prenhes (n= 99)..... 60

ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

ABCZ - Associação Brasileira dos Criadores de Zebu

ANPEP - *alanyl aminopeptidase N*

Be - blastocisto eclodido

Bi - blastocisto inicial

BL - blastocisto

Bx - blastocisto expandido

CA - concentração alta

CB - concentração baixa

CIV - cultivo *in vitro*

CL - corpo lúteo

cm² - centímetro quadrado

CO₂ - dióxido de carbono

COC - complexo *cumulus* oócitos

CXCL-14 - citocina C-X-C ligante 14

D0 - dia do estro

D30 - dia 30 pós-estro

D5 - dia 5 pós-estro

D7 - dia 7 pós-estro

DIF - diferença na concentração plasmática de progesterona

E2 - estradiol

eCG - gonadotrofina coriônica equina

EDTA - ácido tetra-acético etilenediamine de sódio

FGF-10 - fator de crescimento fibroblástico 10

FIV - fecundação *in vitro*

FSH - hormônio folículo estimulante

g - grama

GRP - *gastrin-releasing peptide*

HIF - *hypoxia-inducible factor*
IA - inseminação artificial
IATF - inseminação artificial em tempo fixo
IGFBP1 - fator de crescimento semelhante à insulina ligado a proteína 1
IGFBP3 - fator de crescimento semelhante à insulina ligado a proteína 3
IM - intramuscular
Kg - quilograma
LH - hormônio luteinizante
mg - miligrama
MHz - megahertz
MIF - fator inibitório da migração de macrófago
MIV - maturação *in vitro*
mL - mililitro
mM - milimolar
MM-b - meio de maturação base
mmHg - milímetro de mercúrio
n - número da amostra
ng - nanograma
P4 - progesterona
PBS - tampão fosfato salina
PF - pós-fecundação
PGF2 α - prostaglandina F2 α
PHE - penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV - produção *in vitro*
Q - quartil
S - desvio padrão
SFB - soro fetal bovino
SOFm - *synthetic oviduct fluid modified*
SPTZ - espermatozóide
TALP - tyrode albumina, lactato e piruvato
TE - transferência de embriões

TETF - transferência de embriões em tempo fixo

UI - unidade internacional

US - ultrassom

vs - *versus*

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PÓS-OVULATÓRIA DE PROGESTERONA NAS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS À IATF E NOVILHAS CRUZADAS SUBMETIDAS À TETF

RESUMO - Na IATF e TETF o uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) é recomendado com o objetivo de incrementar as concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e as taxas de concepção. A hipótese do presente estudo é que em fêmeas tratadas com eCG maiores concentrações de P4 são observadas no D5 e D7 (D0 = dia da IATF) em fêmeas prenhes após à IATF e no D5 e D7 (D0 = dia esperado para o estro) em receptoras prenhes submetidas à TETF. No Experimento 1, fêmeas bovinas tratadas ou não com 300UI de eCG e submetidas à IATF, tiveram as concentrações de P4 mensuradas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 após a IATF. No Experimento 2, todas as fêmeas foram tratadas com 300UI de eCG e submetidas à IATF, sendo mensuradas as concentrações de P4 nos dias 3, 5, 7, 12 e 17 após a IATF. No Experimento 3, receptoras tratadas com 300UI de eCG, foram submetidas à TETF, após a observação da presença ou não de estro e as concentrações de P4 foram avaliadas nos dias 5 e 7, após o dia esperado do estro. A dosagem de P4 foi realizada pela técnica de radioimunoensaio e o diagnóstico de gestação através da ultrassonografia. No Experimento 1, observou-se que animais tratados com eCG apresentaram maior concentração de P4 nos dias 0, 7 e 10. No Experimento 2, não houve diferença significativa na concentração de P4 nos dias 3, 7 e 12, entre os animais prenhes e não prenhes, entretanto no dia 17 os animais não prenhes tiveram menor concentração de P4. No Experimento 3, maiores concentrações de P4 no D7 foram observadas em animais que não apresentaram estro e maiores concentrações de P4 foram detectadas em animais prenhes no D7. Conclui-se que em fêmeas tratadas com eCG maiores concentrações de P4 não foram observadas no D5 e D7 (D0 = dia da IATF) em fêmeas prenhes após à IATF, entretanto, a taxa de prenhez na TETF de embriões produzidos *in vitro* foi positivamente influenciada pela

manifestação do comportamento de estro e pelas concentrações de P4 no momento da transferência do embrião.

Palavras-chave: Progesterona, Corpo lúteo, Prenhez, eCG, Bovino

EFFECT OF POSTOVULATORY CONCENTRATION OF PROGESTERONE IN CONCEPTION RATES OF ZEBU COWS SUBMITTED TO FTAI AND CROSS HEIFER SUBMITTED TO FTET

SUMMARY - In FTET and FTAI the use of eCG is recommended in order to increase the synthesis of P4 and the conception rates. The hypothesis of this study is that females treated with eCG higher concentrations of P4 are observed on the D5 and D7 (D0 = day of FTAI) in pregnant females after the FTAI and on the D5 and D7 (D0 = day of expected estrus) in pregnant recipients submitted to FTET. In Experiment 1, cows treated or not with 300 IU of eCG and submitted to FTAI had the concentration of P4 measured on days 0, 3, 5, 7 and 10 after FTAI. In Experiment 2, all females were treated with 300 IU of eCG and submitted to FTAI, being measured the concentration of P4 on days 3, 5, 7, 12 and 17 after FTAI. In Experiment 3, recipients treated with 300 IU of eCG were submitted to FTET, after observation the presence or absence of estrus and measured the concentration of P4 on days 5 and 7 after the expected day of estrus. The P4 assay was performed by radioimmunoassay and pregnancy diagnosis by ultrasonography. In Experiment 1 was observed that animals treated with eCG showed higher concentration of P4 on days 0, 7 and 10. In Experiment 2 there was no significant difference in the concentration of P4 on days 3, 7 and 12 between non-pregnant and pregnant animals, since the day 17 non-pregnant animals had lower concentration of P4. In Experiment 3 highest concentrations of P4 in D7 were observed in animals that did not show estrus and higher concentrations of P4 were detected in pregnant animals on D7. It is concluded that in females treated with eCG higher concentrations of P4 were not observed in D5 and D7 (D0 = day of FTAI) in the pregnant after FTAI, however, the pregnancy rate in FTET embryos produced *in vitro* was positively influenced by the manifestation of behavioral oestrus and by concentration of P4 at the time of embryo transfer.

Keywords: Progesterone, Corpus luteum, Pregnancy, eCG, Bovine

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce rapidamente de forma proporcional ao aumento da população (FEDOROFF et al., 2010). O Brasil ocupa a posição de líder mundial nas exportações de carne bovina e tem recebido grande atenção mundial devido ao modelo de criação extensiva e potencial de incremento na produção. Em 2012, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 185.836.144 animais, sendo 79% dos animais destinados à produção de carne. A produção nacional de carne bovina foi de 7.953.562 toneladas, proveniente do abate 41.200.000 cabeças, sendo 1.579.000 toneladas do produto destinadas às exportações que representa 19,9% da produção (ANUALPEC, 2012).

Atualmente o Brasil apresenta uma taxa de desfrute (número de animais abatidos dividido pelo número total de animais x 100) de 22,2% e abate carcaças com um peso médio de 15 arrobas (ANUALPEC, 2012). Em comparação, os norte americanos desfrutam de 36% do seu rebanho e abatem carcaças pesando em média 24 arrobas (ANUALPEC, 2012). Embora detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, o Brasil apresenta uma eficiência na produção pecuária aquém da necessária, caracterizada inclusive pela baixa eficiência reprodutiva nas operações de cria.

Na criação de bovinos a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um intervalo entre partos de 12 meses, gerando a produção de 1 bezerro/matriz/ano. Em 2011, o rebanho nacional era composto por 74.487.416 matrizes, destas 61.412.949 eram vacas e 13.074.467 novilhas com mais de 24 meses. Em 2012, estima-se que o Brasil produzirá 50.510.868 bezerros (ANUALPEC, 2012). Quando se estabelece uma relação entre o número de matrizes em idade reprodutiva e o número de bezerros nascidos no ano subsequente, estima-se uma produção nacional média de 0,67 bezerro/matriz/ano, caracterizando um intervalo entre partos de 18 meses (ANUALPEC, 2012). Conclui-se que a baixa eficiência reprodutiva nas operações de cria, caracterizada pela baixa eficiência na

produção de bezerros nascidos reduz a lucratividade e a competitividade do setor pecuário.

A avaliação crítica do mercado financeiro e rentabilidade agropecuária em 2010 permitiram demonstrar que o investimento de maior lucratividade sobre o capital investido foi o ouro (32,26%), seguido pela produção de leite com alta tecnologia (11,42%), poupança (6,90%), produção com ciclo completo na pecuária de corte (5,76%) e cria e engorda exclusivamente (5,07%). As operações restritas apenas a fase cria de bovinos de corte com alta e baixa tecnologia foram de 1,62% e -1,38%, respectivamente (SCOT CONSULTORIA, 2011). Assim, assume-se que a rentabilidade da fase de cria requer sua inserção no ciclo completo da criação de bovinos de corte e o crescente emprego de tecnologia para que a mesma se torne economicamente viável.

Mantendo-se baixa a eficiência reprodutiva, a única maneira de se aumentar o volume de carne produzido é aumentando a área destinada à exploração pecuária. Contudo, tal prática é indesejável pelas óbvias implicações ambientais negativas. Assim, torna-se evidente a importância de se aumentar a eficiência reprodutiva das explorações pecuárias com o objetivo de incrementar a produção de carne, sem necessariamente aumentar o número de matrizes. Para tanto, torna-se imprescindível aumentar a taxa de prenhez (número de bezerros nascidos dividido pelo número de fêmeas em reprodução x 100) e concepção (número de bezerros nascidos dividido pelo número de fêmeas inseminadas x 100). Entretanto, para que a bovinocultura brasileira atinja maiores níveis de produtividade, além da eficiência reprodutiva, a qualidade genética dos animais prioriza ser melhorada (BARUSELLI et al., 2006).

Tais requisitos tem alavancado o emprego da inseminação artificial (IA). Para otimizar o emprego da IA, foram desenvolvidos tratamentos que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de 100% das fêmeas tratadas em um momento pré-determinado, procedimento que exclui a necessidade da detecção de estros. Além disso, a IATF permite induzir à ciclicidade de fêmeas em anestro (PURSLEY et al., 1995; VASCONCELOS, 1994; DAY, 2005).

Estima-se que 10.400.000 fêmeas bovinas tenham sido inseminadas em 2010, destas aproximadamente 50% por IATF (ASBIA, 2011). Apesar dos bons resultados obtidos com o emprego da IATF, as taxas de prenhez à primeira inseminação dificilmente são maiores que 60% em vacas de corte e 30% em vacas leiteiras de alta produção, indicando que uma proporção expressiva de fêmeas inseminadas falha em se tornar prenhe. No Brasil, a taxa de concepção em matrizes de corte comerciais submetidas à IATF é de 49,1% (SÁ FILHO et al., 2009).

Considerando a importância do incremento genético aliado ao aumento da eficiência reprodutiva, o Brasil também se tornou líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). A TETF aliada à produção de embriões *in vitro* constituem biotécnicas poderosas na disseminação de produtos nascidos oriundos de animais geneticamente superiores. Entretanto, as taxas de concepção no emprego da TETF dificilmente superam 50%. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), no ano de 2011 foram produzidos 172.000 embriões Nelore no Brasil, com uma taxa de prenhez média de aproximadamente 33,3% (ABCZ, 2011).

As causas desta fertilidade aquém da almejada obtidas nos procedimentos de IATF e TETF podem estar relacionadas às falhas de sincronização (SÁ FILHO et al., 2005) ou a fatores que influenciam a taxa de concepção (DIAS, 2007). Dentre os fatores que podem influenciar a taxa de concepção estão o diâmetro máximo do folículo ovulatório, diâmetro do corpo lúteo (CL), capacidade de produção de progesterona (P4) pelo CL e o ambiente tubárico e uterino gerado antes e depois da ovulação (SIROIS e FORTUNE, 1990; MIHM et al., 1994; REVAH e BUTTLER, 1996; MUSSARD et al., 2002; MUSSARD et al., 2003a; PERRY et al., 2005).

O efeito da concentração de P4 no período pós-ovulatório na taxa de concepção tem sido bastante estudado, mas os resultados apresentados são bastante variáveis (HENRICKS et al., 1971; MANN e LAMMING, 1999; MANN et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004; STARBUCK et al., 2006; DEMÉTRIO et

al., 2007). A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária, pela ação da P4 em controlar mudanças no útero além de influenciar o crescimento embrionário (GEISERT et al., 1992). A maior parte dos estudos permitiu ilustrar que maiores concentrações de P4 são observadas no período crítico da gestação, compreendido entre o 15º e o 19º dia após a IATF, em fêmeas que se tornaram prenhes. Entretanto, alguns estudos recentes permitiram sugerir a importância da presença de maiores concentrações de P4 na primeira semana após a ovulação como um fator determinante no sucesso do estabelecimento da prenhez. A maior proporção dos trabalhos demonstra que existe efeito benéfico da maior concentração de progesterona pós-IA na taxa de prenhez, porém dados com fêmeas zebuínas são escassos na literatura.

Diante deste contexto, esforços devem ser feitos a fim de melhorar o êxito nas taxas de concepção de fêmeas submetidas à IATF e TETF, tornando necessário um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos no sucesso da prenhez. A concentração de progesterona no período pós-ovulatório poderia ser utilizada como um parâmetro para estimar o sucesso da prenhez. Na transferência de embriões em tempo fixo (TETF), a possibilidade de selecionar receptoras com maiores chances de prenhez possibilitaria um aumento significativo no sucesso desta biotecnologia.

A hipótese do presente estudo é que em fêmeas tratadas com eCG maiores concentrações de P4 são observadas no D5 e D7 (D0 = dia da IATF, segundo dia após a remoção do dispositivo intravaginal de P4) em fêmeas prenhes após à IATF e no D5 e D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras prenhes submetidas à TETF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM REBANHOS BOVINOS DE CORTE

A lucratividade do sistema de produção de gado de corte está intimamente relacionada com a eficiência reprodutiva do rebanho (HILL, 1998). Em propriedades especializadas na produção de novilhos para o abate, as baixas taxas de natalidade e as altas taxas de mortalidade dos bezerros, certamente representam os principais fatores na composição dos custos. No Brasil, infelizmente, são registradas baixas taxas de natalidade e altas taxas de mortalidade que, associadas, caracterizam longos intervalos entre partos, em média 18 meses. A eficiência reprodutiva é o fator que, isoladamente, mais afeta a produtividade e a lucratividade de um rebanho (BARUSELLI et al., 2006).

Sabe-se que fêmeas bovinas zebuínas possuem uma gestação de aproximadamente 290 dias e que após o parto as matrizes passam por um estado fisiológico, com duração de aproximadamente 45 dias, conhecido como anestro pós-parto. Tal período permite a completa involução uterina e o restabelecimento dos mecanismos endócrinos responsáveis pela ciclicidade das fêmeas, tendo seu final determinado pela primeira ovulação fértil (YAVAS; WALTON, 2000). Com a duração média de um ciclo estral de 21 dias, adicionado ao período de anestro pós-parto e ao da gestação, torna-se um grande desafio obter um intervalo entre partos de 365 dias.

Para que a bovinocultura brasileira atinja maiores níveis de produtividade a eficiência reprodutiva e a genética são áreas que priorizam ser melhoradas (BARUSELLI et al., 2006). Tal requisito tem alavancado o emprego de biotecnologias, dentre as principais a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IATF exclui a necessidade de detecção de estros, principal fator limitante no sucesso do emprego da IA convencional, possibilitando uma taxa de serviço de 100%. Além disso, o emprego da IATF faz com que vacas em

anestro possam responder ao protocolo hormonal empregado apresentando boa chance de concepção à IATF (LOPES, 2009).

Muito tem sido feito no Brasil, e particularmente no estado de São Paulo, em relação ao desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam maximizar as taxas de serviço. Apesar dos bons resultados, as taxas de prenhez à primeira IATF são em média de 50% em vacas de corte e 30% em vacas leiteiras de alta produção, indicando que uma proporção importante de fêmeas inseminadas falham em se tornar prenhes. As taxa de prenhez em rebanhos comerciais no Brasil é de 49,1% (BARUSELLI et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2009), ou seja, baixas taxas de concepção têm limitado acréscimos nas taxas de prenhez. De fato, 20 a 40% das falhas de concepção decorrem da mortalidade embrionária que ocorre nas três primeiras semanas de gestação, segundo Vanroose et al. (2000) e dados obtidos do rebanho zebuino no estado de São Paulo (VANROOSE et al. 2000; MACHADO et al. 2009). Em rebanhos bovinos, a mortalidade embrionária é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004) e Sartori et al. (2004).

2.2 MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE

Nos primeiros sete dias pós-inseminação a mortalidade embrionária foi associada à falhas de fertilização, defeitos genéticos e anormalidades no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Neste período, a mortalidade normalmente é inferior a 10%, mas em vacas de leite sob estresse calórico pode ultrapassar 40% (SARTORI et al., 2002; SARTORI, 2004).

Diskin e Sreenan (1980) verificaram, em novilhas de corte, que falhas de fertilização até o dia 8 pós-inseminação são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-inseminação contribuem com mais de 30% dos referidos casos. De fato, Humblot (2001) reportou em rebanhos franceses, 20,5 a 43,6% de mortalidade embrionária até o dia 25 pós-inseminação. Santos et al. (2004) sugeriram que

a mortalidade embrionária se aproxime de 60% até 28 dias pós-inseminação, para vacas de leite de alta produção. Em complemento, Kunz et al. (2002) encontraram em vacas de corte taxas de mortalidade entre 20 e 40%, até 22 dias pós-inseminação. Estudos onde vacas leiteiras lactantes foram submetidas à transferência de embriões e ao diagnóstico precoce da gestação por ultrassonografia observou-se que menos de 50% dos embriões viáveis estabelecem a gestação entre 27-30 dias após a ovulação (SARTORI et al., 2003). Tais dados justificam relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (SREENAN e MULVEHILL, 1975; ROCHE et al., 1977) e de 53% para vacas de raças especializadas na produção de carne (ROCHE et al., 1977).

Com base nos sumários estatísticos, desempenho produtivo e comercial torna-se pertinente admitir que perdas precoces de prenhes sejam elevadas. Considerando que o rebanho nacional atualmente é representado por 72 milhões de fêmeas em reprodução, 59 milhões de vacas e 13 milhões de novilhas com mais de 24 meses de idade, e que a mortalidade embrionária atinge entre 15 e 40% das fêmeas acasaladas, podem-se estimar perdas entre 10 e 29 milhões de conceitos por período reprodutivo.

Experimentos realizados de forma independente por diferentes grupos de pesquisa demonstraram direta ou indiretamente a correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de P4 em bovinos, desenvolvimento embrionário e taxas de prenhez ao final do primeiro mês de gestação. Estudos realizados na década de 70 permitiram a observação de que em bovinos os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorrem no período especialmente compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação posteriormente designado de “período crítico” (BINELLI et al., 2001). Entretanto, alguns estudos recentes permitiram sugerir a importância da presença de maiores concentrações de P4 na primeira semana após a ovulação como um fator determinante no sucesso do estabelecimento da prenhez. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos

envolvidos neste período específico dentro do ciclo reprodutivo das fêmeas bovinas torna-se crucial.

2.3 MECANISMOS ENDÓCRINOS DE AÇÃO DA PROGESTERONA

As concentrações de P4 apresentam variações cíclicas durante o ciclo estral que refletem as fases de crescimento, manutenção e regressão do corpo lúteo (CL). A concentração plasmática de P4 está relacionada com sua produção e liberação pelo CL e suas taxas de metabolização e eliminação, que podem ser influenciadas pelo fluxo sanguíneo, disponibilidade de precursores e fatores luteotróficos (VIANA et al., 1999).

De modo geral, as oscilações hormonais fisiológicas que ocorrem no ciclo estral em ruminantes determinam fases distintas de dominância entre os hormônios esteróides sexuais, estradiol (E2) e progesterona (P4). Sabe-se, por exemplo, que esses hormônios exercem mecanismos de *feedback* positivo e negativo junto ao hipotálamo e hipófise de acordo com as suas concentrações durante as diferentes fases do ciclo estral, que são comuns a várias espécies. Em animais gestantes, além dos efeitos alcançados pela inibição ou estimulação hipotalâmica e/ou hipofisária que culminam no desenvolvimento folicular e ovulação, os hormônios esteróides também estão envolvidos no controle de eventos que ocorrem em microambientes específicos no trato reprodutivo feminino. Por exemplo, na primeira semana pós-ovulação ocorre o trânsito do ooócito e dos espermatozóides na tuba uterina, bem como a interação dos mesmos com as células epiteliais daquele órgão, capacitação espermática, fecundação, crescimento embrionário inicial e o trânsito do embrião da tuba para o ambiente uterino. A predominância de exposição do oviduto e endométrio aos hormônios esteróides ovarianos na seqüência, P4-E2-P4 durante diestro, proestro-estro e metaestro, respectivamente, torna-se fundamental para o sucesso de tais eventos e, ultimamente, para a sobrevivência do embrião (MILLER e MOORE, 1976).

Alterações no endométrio induzidas pela P4 que possibilitam a implantação do embrião e a necessidade de um mecanismo desencadeado pelo embrião para evitar a luteólise, indicam a importância da P4 no estabelecimento e manutenção da gestação. Sreenan e Diskin (1983) observaram que vacas leiteiras de produção moderada somaram 40% de perdas embrionárias e fetais, enquanto que vacas de alta produção atingiram 56% de perdas. Além disso, estudos mais recentes determinaram que 41% a 67% dos embriões gerados por vacas de produção leiteira moderada a alta, coletados no dia 7 pós-estro, eram anormais, em comparação a 17% e 28% de embriões anormais gerados por novilhas e vacas secas (DISKIN e MORRIS, 2008). A conexão entre vacas leiteiras de alta produção e baixos índices reprodutivos parece estar relacionada às concentrações plasmáticas de P4 desses animais. Apesar da correlação positiva existente entre o tamanho do folículo ovulatório, tamanho do corpo lúteo e produção de P4 (SARTORI et al., 2002), bovinos de leite que comumente apresentam uma correlação positiva entre produção de leite e o tamanho do folículo ovulatório, possuem baixas concentrações plasmáticas de P4 (VASCONCELOS et al., 1999). A existência dessa correlação inversamente proporcional entre produção leiteira e concentrações de P4 é supostamente devida à elevada taxa de metabolização do hormônio em vacas de alta produção (SANGSRITAVONG et al., 2002). Além disso, a produção leiteira medida no dia 7 pós-estro foi inversamente proporcional à probabilidade de concepção no dia 28 em vacas leiteiras (DEMÉTRIO et al., 2007). Uma possível interpretação desses estudos é que as baixas concentrações de P4 observadas em vacas de alta produção leiteira podem ser a justificativa para os baixos índices reprodutivos dessa categoria animal.

Outras evidências do envolvimento da P4 no desenvolvimento embrionário vêm de estudos em bovinos que mediram variáveis mais diretamente relacionadas à viabilidade do embrião. Estes estudos demonstraram que concentrações mais altas de P4 no dia 5 pós-estro, ou a suplementação de P4 nos dias 1 a 4 ou 5 a 9 pós-inseminação favoreceram o

desenvolvimento embrionário, induziram a secreção de proteínas para o fluido uterino e estimularam a produção de interferon- τ (GREEN et al., 2005; MANN et al., 2006). Além disso, no estudo supracitado conduzido por Demétrio et al. (2007) determinou-se ainda que houve correlação positiva entre concentração de P4 no dia 7 e probabilidade de concepção em vacas inseminadas após um ciclo estral sincronizado. Em contraste, nesse mesmo estudo observou-se que a probabilidade de concepção de animais que receberam transferência de embriões no dia 7 pós-estro não foi afetada pela concentração plasmática de P4, medida no mesmo dia. Dessa forma, sugere-se que há um papel importante desempenhado pela P4 no desenvolvimento embrionário precoce, mais precisamente dentro da primeira semana de gestação.

Além das evidências existentes sobre a influência direta da P4 no controle da expressão gênica e protéica da tuba e do endométrio e, conseqüentemente, no desenvolvimento embrionário precoce, sabe-se também que a sequência e amplitude da exposição aos hormônios esteróides E2 e P4 é igualmente importante nessa regulação. Baseado no estudo de Vasconcelos et al. (2001), sabe-se que um folículo ovulatório maior tem maior capacidade de produção de E2, e que o tamanho deste folículo está positivamente correlacionado com o tamanho do CL formado a partir de sua ovulação e com a capacidade deste CL de produzir P4.

2.4 MECANISMOS MOLECULARES DE AÇÃO DA PROGESTERONA

Apesar da existência de estudos demonstrando a expressão gênica diferencial do endométrio em diferentes fases do ciclo estral ou mesmo na gestação inicial, tais estudos em sua maioria abordaram a fase luteal tardia durante o ciclo ou em torno do reconhecimento materno da gestação. Há indicações de que concentrações insuficientes de P4 nos primeiros sete dias de gestação resultam em desenvolvimento sub-ótimo do concepto e baixas taxas de concepção. Contudo, são limitados os dados quanto à identidade das

moléculas reguladas pela P4 e que podem potencialmente favorecer o desenvolvimento embrionário durante a primeira semana pós-estro. Sabe-se também que a expressão gênica do endométrio bovino varia de acordo com a fase do ciclo estral (ou gestação inicial), uma vez que o padrão de expressão é controlado pelas proporções entre E2 e P4 circulantes, bem como pela proporção entre os receptores desses esteróides no tecido alvo. De fato, a detecção de RNA mensageiro e proteína para o receptor de P4 tanto no epitélio quanto no estroma endometrial em vacas leiteiras secas, novilhas de corte e ovelhas permitem sugerir tais compartimentos uterinos como alvos potenciais para a ação desse hormônio esteróide (SPENCER e BAZER, 1995; ROBINSON, 2001). Recentemente, utilizando vacas Nelore com ciclo estral sincronizado, Martin et al. (2008) determinaram que a intensidade de expressão máxima de receptores de P4 ocorreu no epitélio glandular entre os dias 0, 5 e 9 do ciclo estral, e no estroma endometrial no dia 5 do ciclo estral.

Como consequência das variações na produção de E2, P4 e seus receptores, também variam a síntese e secreção de proteínas pelas células epiteliais na tuba uterina e em relação à regulação de genes endometriais, uma série de genes induzidos pela P4 e estimulados pelo interferon- τ foram descobertos através da suplementação de ovelhas intactas com P4, ou da administração de P4 e interferon- τ em ovelhas ovariectomizadas. Dentre os processos biológicos ligados a biologia uterina e associados com os genes identificados, pode-se mencionar: transporte de aminoácidos e glicose (SLC2A1, SLC5A1, SLC7A2B), migração celular (IGFBP1, GRP), invasividade (IGFBP1, Cathepsin L, FGF-10), proteólise (Cathepsin, Cystatin, ANPEP), quimioatração (FGF-10, MIF, CXCL14), aderência (GRP, Galectin), formação de vasos sanguíneos (GRP, HIF), proliferação celular/apoptose (IGFBP1, IGFBP3, FGF-10) (SATTERFIELD et al., 2006; SONG et al., 2006). Assim, supõe-se que ao menos parte dos efeitos positivos da P4 decorra da estimulação do endométrio levando a um padrão específico de expressão gênica do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma, e à secreção de proteínas necessárias à formação do fluido luminal uterino (histotrófo). A

composição do histotrófo provavelmente afeta o desenvolvimento do conceito, já que durante as primeiras semanas de gestação o mesmo se encontra totalmente envolvido pelo fluído uterino e não tem contato direto com a circulação materna.

2.5 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA NAS TAXAS DE CONCEPÇÃO

A concentração de progesterona pós-IA tem sido bastante estudada, mas os resultados são variáveis (HENRICKS, et al., 1971; McNEIL, et al., 2006; NOGUEIRA, et al., 2004). A maior proporção dos trabalhos demonstra que existe um efeito benéfico da maior concentração de progesterona pós-IA na taxa de prenhez, porém dados com fêmeas Nelore são escassos na literatura.

O efeito da concentração de P4 após a IA no aumento da taxa de concepção foi evidenciado em vários estudos (HENRICKS et al., 1971; McNEIL et al., 2006; MANN e LAMMING, 1999; MUSSARD, et al., 2002; PERRY, et al., 2005, MUSSARD, et al., 2003; MUSSARD, BURKE e DAY, 2003; PERRY, et al., 2007). A administração de P4 após a IA melhorou o desenvolvimento dos embriões, que eram maiores e apresentaram maior secreção de proteínas, indicando serem mais maduros e funcionais (GARRETT, et al., 1988). O desenvolvimento do embrião é crítico para suprimir a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ e promover a manutenção do corpo lúteo, pois, a secreção de interferon- τ está relacionada com o desenvolvimento do embrião, inibindo a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio (THATCHER e HANSEN, 1992).

A correlação positiva entre o diâmetro folicular e a concentração de P4 no diestro com a taxa de prenhez foi verificada por vários autores (MUSSARD et al, 2002; PERRY et al, 2007). Portanto estratégias que promovem o aumento do diâmetro folicular também aumentam a concentração de P4 no diestro e a taxa de prenhez. A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da

égua prenhe 40 a 130 dias (MURPHY e MARTINUK, 1991) e que se liga aos receptores foliculares de FSH e de LH e aos receptores de LH do corpo lúteo (STEWART e ALLEN, 1981). A eCG, comumente utilizada nos programas de IATF e TETF, cria condições de crescimento folicular e de ovulação, e seu uso tem-se mostrado compensador em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade, em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses) e em animais com condição corporal comprometida (BARUSELLI et al., 2004).

Pesquisa realizada com 215 vacas Nelore paridas (75 ± 19 dias pós-parto) mantidas a pasto no Estado de Mato Grosso do Sul (BARUSELLI et al., 2003) indicou que o grupo que recebeu eCG no momento da retirada do dispositivo apresentou maior taxa de concepção após a IATF (38,9 vs 55,1%). Quando foi avaliada a condição ovariana dos animais tratados, constatou-se que o efeito positivo da eCG aumentou conforme aumentou o grau de anestro. Os resultados positivos da utilização da eCG conforme o grau de ciclicidade também foram constatados em pesquisa realizada na Argentina (CUTAIA et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar os efeitos do uso da eCG em programas de IATF utilizando P4, analisou-se a dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro sincronizadas com P4 e eCG (SÁ FILHO et al., 2004). Os animais foram tratados com P4 e 5mg de Valerato de estradiol associado a 3 mg de Norgestomet intramuscular no dia 0. O implante foi removido no dia 9 e os animais foram divididos conforme o tratamento ou não com eCG na retirada do implante exames ultrassonográficos foram realizados durante o tratamento para acompanhamento da dinâmica folicular. Verificou-se que o tratamento com eCG, em vacas Nelore em anestro pós parto no momento da retirada do Crestar, aumentou o diâmetro máximo do folículo dominante ($1,22 \pm 0,66$ vs. $1,04 \pm 0,07$ mm; $p < 0,05$), aumentou a taxa de ovulação (73,1 vs 50%; $p < 0,05$) e de concepção (46,2% vs. 20,8%; $p < 0,05$). A capacidade da eCG em se ligar a receptores de LH e FSH (MURPHY, 1991) deve ser responsável pelo efeito da eCG em aumentar o diâmetro folicular e a taxa de sincronização (SÁ FILHO et al., 2004).

O aumento na taxa de concepção após o tratamento com eCG pode ser também devido ao incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona após a ovulação, conforme descrito por Mann et al. (1999). No Brasil, Reis et al. (2004) também verificaram correlação positiva entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção em receptoras de embrião bovino. Assim, o aumento da taxa de concepção em animais tratados com eCG pode estar relacionado ao incremento na taxa de ovulação, principalmente em animais em anestro e ao aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro do ciclo subsequente à IATF, que pode melhorar o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação.

A estimulação do folículo pré-ovulatório com eCG, resulta em maior volume do corpo lúteo e concentração de progesterona no dia 7 pós-estro (BARUSELLI, 2004; PERES, 2009), além de melhorar os índices de concepção de vacas (BARUSELLI, 2004; PERES, 2009; SÁ FILHO, 2009), supostamente pelo efeito benéfico da maior concentração plasmática de progesterona observada desde a fase luteínica inicial.

No presente estudo, acredita-se que em fêmeas tratadas com eCG, maiores concentrações plasmáticas de P4 são evidenciadas no período pós-ovulatório em fêmeas prenhes quando comparadas às não prenhes.

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que em fêmeas tratadas com eCG maiores concentrações de P4 são observadas no D5 e D7 (D0 = dia da IATF, segundo dia após a remoção do dispositivo intravaginal de P4) em fêmeas prenhes após à IATF e no D5 e D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras prenhes submetidas à TETF.

4. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar em fêmeas tratadas com eCG se maiores concentrações de P4 no D5 e D7 determinam maiores taxas de concepção em fêmeas submetidas à IATF (D0 = dia da IATF) ou à TETF (D0 = dia esperado para o estro). Para tanto, tornaram-se objetivos específicos: comparar as concentrações de P4 de fêmeas prenhes ou não nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 após a IATF realizada no D0 de fêmeas tratadas ou não com 300 UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona (Experimento 1); avaliar o perfil das concentrações de P4 de fêmeas prenhes ou não, todas tratadas com 300 UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, nos dias 3, 5, 7, 12 e 17 após a IATF realizada no D0 (Experimento 2) e correlacionar a prenhez com presença ou não da manifestação de estro e as concentrações de P4 nos dias 5 e 7 de receptoras submetidas a TETF no dia 7 (Experimento 3).

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 EXPERIMENTO 1

5.1.1 Local do Experimento. O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), localizada em Andradina, situada no estado de São Paulo. O município apresenta -20,89611^º de latitude, -51,37944^º de longitude, 405 metros de altitude e caracteriza-se como uma região de clima tropical. A mensuração das concentrações plasmáticas de P₄ foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, na cidade de Araçatuba, no estado de São Paulo.

5.1.2 Animais. Foram utilizadas 127 vacas zebuínas, da raça Nelore (n=93) e Guzerá (n=34), não prenhes e cíclicas. As fêmeas foram previamente avaliadas quanto à idade, peso e escore de condição corporal na classificação de 1 (magra) a 5 (obesa), e apresentaram um escore médio de 3,0. As vacas foram mantidas durante o experimento em piquetes formados por *Brachiaria decumbens* cv. marandu, com livre acesso à sal mineral e água. O experimento foi desenvolvido em janeiro de 2011 e fevereiro de 2012, em um total de três repetições, que serão designadas de replicatas.

5.1.3 Sincronização dos estros e das ovulações. A condição ovariana foi avaliada 24 horas antes do início da aplicação do protocolo para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), por exame ultrassonográfico transretal dos ovários (Aparelho Marca Landwind Modelo C40 VET) com transdutor linear de 7,5 MHz. As fêmeas tiveram os estros sincronizados pelo uso de um dispositivo intravaginal contendo 1 g de progesterona (Cronipress® - Biogênese) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (RIC-BE® - Tecnopec), via intra-muscular (IM). Após oito dias, retirou-se os dispositivos e os animais receberam uma injeção de 2mg de Dinaprost Trometamina (Lutalyse® - Pfizer) e 0 UI (n=37) ou 300 UI (n=90) de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Novormon® - Syntex), via IM, no momento da retirada do dispositivo. Depois de 24 horas da retirada do implante, as fêmeas receberam 1 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin - Farmavet), via IM. Após 36 horas da última injeção, as vacas foram submetidas à IATF. O dia da IATF foi considerado o D0.

5.1.4 Coleta de Sangue e Processamento das Amostras. Amostras de sangue foram coletadas de todas as vacas nos dias D0, D3, D5, D7 e D10. Aproximadamente 4 mL de sangue foi coletado por venopunção da veia caudal mediana. O sangue foi cuidadosamente desprendido em um tubo de vidro com vácuo (Vacutainer Systems, Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo como anticoagulante o ácido tetracético etilenediamine de sódio

(EDTA). Em seguida, o tubo foi invertido lentamente repetidas vezes até que fosse suficientemente homogeneizado com o EDTA e acondicionado a 4°C até que fosse centrifugado. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (Centrífuga Marca Centribio) a 2900 x *g* por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a remoção do plasma que foi armazenado em microtubos e acondicionado a -20°C até a realização da técnica de radioimunoensaio.

5.1.5 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de Progesterona. As concentrações de P4 foram mensuradas pela Técnica de Radioimunoensaio; utilizando kits comerciais (Count-a-Count®, DPC, Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, EUA). Para a avaliação das amostras foram realizados um total de três ensaios. Foram utilizadas amostras de referência contendo concentrações altas (CA) e baixas (CB) de P4. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,40%; 4,60% e 4,13% para CA e 0,17%; 0,12% e 0,20% para a CB. O coeficiente inter-ensaio foi 4,30% para a CA e 7,30% para a CB.

5.1.6 Diagnóstico de Gestação. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias de gestação através de exame ultrassonográfico (Aparelho Marca Landwind Modelo C40 VET) com transdutor linear de 5mHz. As fêmeas foram classificadas em prenhes (presença do feto) ou não prenhes (ausência do feto).

5.1.7 Análise Estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2003; SAS Institute, Cary, NC, USA). As variáveis respostas contínuas analisadas foram: concentração de P4 no D0; concentração de P4 no D3; concentração de P4 no D5; concentração de P4 no D7; concentração de P4 no D10; diferença da concentração de P4 entre D5 e D3 (DIF 5-3); diferença da concentração de P4 entre D7 e D5 (DIF 7-5);

diferença da concentração de P4 entre D7 e D3 (DIF 7-3); diferença da concentração de P4 entre D10 e D3 (DIF 10-3); diferença da concentração de P4 entre D10 e D5 (DIF 10-5); diferença da concentração de P4 entre D10 e D7 (DIF 10-7); razão da concentração de P4 entre D5 e D3 ($D5 / D3$); razão da concentração de P4 entre D7 e D5 ($D7 / D5$); razão da concentração de P4 entre D7 e D3 ($D7 / D3$) e razão da concentração de P4 entre D10 e D3 ($D10 / D3$). Os valores das concentrações de progesterona foram testados quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformados conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. As médias das concentrações de progesterona foram analisadas pelo Glimmix, no qual o modelo inicial para todas as variáveis incluiu os efeitos de replicata, tratamento com eCG, prenhez, interação eCG x prenhez e a interação replicata x prenhez. Para a obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas através do critério estatístico de Wald utilizando como critério de remoção o valor de $P > 0,20$. As transformações realizadas e o modelo estatístico final para cada variável estão representados na Tabela 1. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão não transformados.

Tabela 1. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui replicata, eCG, prenhez, interação eCG*pregnhez e interação replicata*pregnhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 1

VARIÁVEIS ANALISADAS	MODELO ESTATÍSTICO INICIAL	TRANSFORMAÇÃO DE DADOS	MODELO ESTATÍSTICO FINAL
Concentração de P4 no D0	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	eCG
Concentração de P4 no D3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	Replicata, eCG
Concentração de P4 no D5	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Raiz Quadrada	Replicata, eCG*pregnhez
Concentração de P4 no D7	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Raiz Quadrada	Replicata, eCG
Concentração de P4 no D10	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	Replicata, eCG, replicata*pregnhez
DIF 5-3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Replicata, eCG
DIF 7-5	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Replicata, eCG
DIF 7-3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Replicata, eCG
DIF 10-3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	Replicata, eCG, replicata*pregnhez
DIF 10-5	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	eCG, replicata*pregnhez
DIF 10-7	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Replicata, eCG, replicata*pregnhez
D7 / D5	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Replicata, eCG
D5 / D3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	Replicata
D7 / D3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	Raiz Quadrada	Replicata, eCG
D10 / D3	Replicata, eCG, prenhez, eCG*pregnhez, replicata*pregnhez	log 10	Replicata, eCG

5.2 EXPERIMENTO 2

5.2.1 Local do Experimento. O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), localizada no município de Andradina, situada no oeste do estado de São Paulo. O município apresenta -20,89611º de latitude, -51,37944º de longitude, 405 metros de altitude e caracteriza-se como uma região de clima tropical. A mensuração das concentrações plasmáticas de P4 foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, na cidade de Araçatuba, no estado de São Paulo. O experimento foi desenvolvido nos meses de janeiro e fevereiro de 2011 em um total de três repetições, que serão designadas de replicatas.

5.2.2 Animais. Foram utilizadas 48 vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), não prenhes e cíclicas. As fêmeas foram previamente avaliadas quanto à idade, peso e escore de condição corporal na classificação de 1 (magra) a 5 (obesa) e apresentaram um escore médio de 3,0. As vacas foram mantidas durante o experimento em piquetes formados por *Brachiaria decumbens* cv. marandu, com livre acesso à sal mineral e água.

5.2.3 Sincronização dos estros e das ovulações. A condição ovariana foi avaliada por exame ultrassonográfico (Aparelho Marca Landwind Modelo C40 VET) transretal dos ovários, 24 horas antes do início da aplicação do protocolo para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Tal avaliação foi realizada com um transdutor linear de 7,5 mHz. As vacas tiveram os estros sincronizados pelo uso de um dispositivo intravaginal contendo 1 g de progesterona (Cronipress® - Biogênesis) associado a uma injeção de 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC-BE® - Tecnopec) via IM. Após oito dias, retirou-se os dispositivos e os animais receberam uma injeção de 2 mg de D-Cloprostenol (Prolise® - Tecnopec) e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Novormon® - Syntex), via IM. Depois de 24 horas da retirada do implante, as

fêmeas receberam 1 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin - Farmavet), via IM. Após 36 horas da última injeção, as vacas foram submetidas à IATF. O dia da IATF foi considerado o D0.

5.2.4 Coleta de sangue e processamento das amostras. As fêmeas foram submetidas à coleta de sangue no D3, D5, D7, D12 e D17. Aproximadamente 4 mL de sangue foi coletado por venopunção da veia caudal mediana. O sangue foi cuidadosamente dispensado em um tubo de vidro com vácuo (Vacuntainer Systems, Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo como anticoagulante o ácido tetracético etilenediamine de sódio (EDTA). Em seguida, o tubo foi invertido lentamente repetidas vezes até que fosse suficientemente homogêneo com o EDTA e acondicionado a 4°C. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (Centrífuga Marca Centríbio) a 2900 x *g* por 30 minutos, em temperatura ambiente. O plasma foi removido, armazenado em microtubos e acondicionado a -20°C até a realização da técnica de radioimunoensaio.

5.2.5 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de Progesterona. As concentrações de P4 foram mensuradas pela Técnica de Radioimunoensaio, utilizando kits comerciais (Count-a-Count®, DPC, Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, EUA). Para a avaliação do total das amostras foram realizados três ensaios. Foram utilizadas amostras de referência contendo concentrações altas (CA) e baixas (CB) de P4. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,13%; 5,59% e 4,20% para CA e 0,13%; 0,15% e 0,32% para a CB. O coeficiente inter-ensaio foi 4,70% para a CA e 7,17% para a CB.

5.2.6. Diagnóstico de Gestação. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a realização da IATF através de exame ultrassonográfico (Marca Landwind Modelo C40 VET) com transdutor linear de 5 MHz. As fêmeas foram classificadas em prenhes (presença do feto) ou não prenhes (ausência do

feto).

5.2.7 Análise Estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2003; SAS Institute, Cary, NC, USA). As variáveis respostas contínuas analisadas foram: concentração de P4 no D3; concentração de P4 no D5; concentração de P4 no D7; concentração de P4 no D12; concentração de P4 no D17; diferença da concentração de P4 entre D5 e D3 (DIF 5-3); diferença da concentração de P4 entre D7 e D5 (DIF 7-5); diferença da concentração de P4 entre D7 e D3 (DIF 7-3); diferença da concentração de P4 entre D12 e D3 (DIF 12-3); diferença da concentração de P4 entre D12 e D5 (DIF 12-5); diferença da concentração de P4 entre D12 e D7 (DIF 12-7); diferença da concentração de P4 entre D17 e D12 (DIF 17-12); razão da concentração de P4 entre D5 e D3 ($D5 / D3$); razão da concentração de P4 entre D7 e D5 ($D7 / D5$); razão da concentração de P4 entre D7 e D3 ($D7 / D3$); razão da concentração de P4 entre D12 e D3 ($D12 / D3$); razão da concentração de P4 entre D12 e D5 ($D12 / D5$) e razão da concentração de P4 entre D12 e D7 ($D12 / D7$). Os valores das concentrações de progesterona foram testados quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformados conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. As médias das concentrações de progesterona foram analisadas pelo Glimmix, no qual o modelo inicial para todas as variáveis incluiu os efeitos de replicata, prenhez e a interação replicata x prenhez. Para a obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram removidas através do critério estatístico de Wald utilizando como critério de remoção o valor de $P > 0,20$. As transformações realizadas e o modelo estatístico final para cada variável estão representados na Tabela 2. Todos os resultados serão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão não transformados.

Tabela 2. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui replicata, prenhez e a interação replicata*prenhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 2

VARIÁVEIS ANALISADAS	MODELO ESTATÍSTICO INICIAL	TRANSFORMAÇÃO DE DADOS	MODELO ESTATÍSTICO FINAL
Concentração de P4 no D3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Prenhez
Concentração de P4 no D5	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
Concentração de P4 no D12	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Prenhez
Concentração de P4 no D17	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	Não Transformado	Replicata, Prenhez
DIF 5-3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
DIF 7-5	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Prenhez
DIF 7-3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
DIF 12-3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Prenhez
DIF 12-5	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	Raiz Quadrada	Prenhez
DIF 12-7	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	Não Transformado	Prenhez
DIF 17-12	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	Não Transformado	Replicata, Prenhez
D5 / D3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata
D7 / D5	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	Não Transformado	Replicata, Prenhez
D7 / D3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
D12 / D3	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
D12 / D5	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez
D12 / D7	Replicata, prenhez, replicata*prenhez	log 10	Replicata, Prenhez

5.3 EXPERIMENTO 3

5.3.1 Local do Experimento. O estudo foi realizado na Fazenda Sundar localizada na cidade de Lins, estado de São Paulo, que apresenta -21° 40' 43" de latitude, -49° 44' 33" de longitude e altitude de 437 metros. A mensuração das concentrações plasmáticas de P4 foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", na cidade de Araçatuba, no estado de São Paulo. O experimento foi conduzido de agosto a outubro de 2011, em um total de quatro repetições, que serão designadas de replicatas.

5.3.2 Animais. Foram utilizadas 267 novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*), oriundas de cruzamento de vacas Nelore com touros Angus, Simental ou Red Angus. As fêmeas eram não gestantes, de idade variável, com um peso médio de 350 Kg (350 Kg $\pm$ 20 Kg) e com escore de condição corporal entre 6 e 8 (na escala de 1 a 9). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em piquetes, com água a disposição. A alimentação foi baseada no pastejo *Brachiaria decumbens* complementada por suplementação mineral (Sal Mineral Fosbovi 20; Tortuga®). Antes de iniciar o experimento todos os animais foram vermifugados com Ivergen Premiun (Ivermectina 1,13%; Biogênesis). As novilhas receberam duas doses de vacina para Leptospirose (Bioleptogen®; Biogênesis), IBR e BVD (Bioabortogen®; Biogênesis, Curitiba - PR) e Clostridioses (Bioclostrigen®), todas com um intervalo de 21 dias. Imediatamente antes do início do protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF), as fêmeas foram avaliadas com auxílio do ultrassom (Aparelho Aloka 500, Aloka Inc., Wallingford, CT) equipado com transdutor linear de 5 MHz. Pela avaliação das características ovarianas as novilhas foram classificadas em púberes e pré-púberes. Tal caracterização ovariana foi determinada pelas estruturas funcionais presentes no ovário, bem como o diâmetro do folículo. Animais com presença de corpo lúteo (CL) ou folículo maior que 0,8mm, foram classificados como púberes, entretanto animais sem

tais estruturas, ou seja, ausência de CL ou folículos menores que 0,8mm foram considerados pré-púberes (VALENTIN et al., 2008). No presente estudo, foram utilizadas apenas as novilhas caracterizadas como púberes. O experimento foi realizado em quatro repetições, que serão designadas de replicatas.

5.3.3 Sincronização dos estros e das ovulações no protocolo de TETF. No dia - 11 (D -11) os animais receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona (Cronipress® 1g; Biogênese, Curitiba - PR) de segundo uso, utilizados em protocolo anterior por 8 dias. Na colocação do dispositivo as novilhas receberam 1 mg de Benzoato de Estradiol (Bioestrogen® 1mg; Biogênese, Curitiba - PR), via IM. O dispositivo permaneceu no animal durante 8 dias. No momento da retirada do dispositivo (D -3) as novilhas receberam 0,150 mg de D-Cloprostenol (Croniben® 0,075mg; Biogênese, Curitiba - PR), 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (Novormon® 5000 UI; Intervet Schering, Cotia - SP) e 0,6mg de cipionato de estradiol (ECP® 2 mg/mL; Pfizer, São Paulo - SP), todos via IM. A partir de 3 dias após a retirada do implante (D0), os estros foram observados duas vezes ao dia por três dias consecutivos, no período das 7 às 7:30 horas e das 16:30 às 17:00 horas. O protocolo de sincronização dos estros e da ovulação está representado na Figura 1.

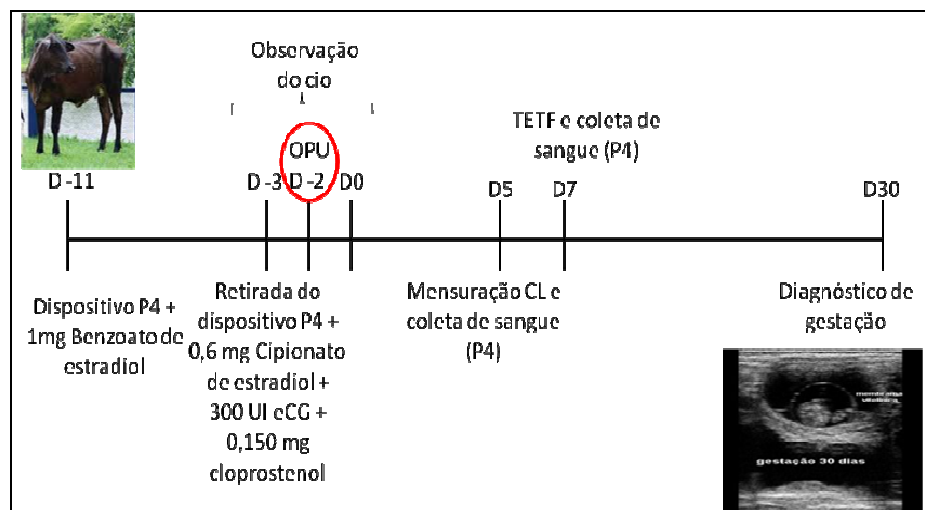


Figura 1. Protocolo dos procedimentos de sincronização dos estros e das ovulações, observações de estros, mensuração do CL, coletas de sangue e diagnóstico de gestação realizados no Experimento 3.

5.3.4 Aspiração de oócitos das fêmeas doadoras. No dia 2 (D2), 26 doadoras das raças Nelore (n=18) e Gir (n=8), localizadas em uma única fazenda na cidade de Lins-SP, foram aspiradas para a coleta dos oócitos via punção folicular guiada por ultrassom (OPU). Os animais foram contidos e foi realizada a anestesia epidural caudal com 5 mL de lidocaína 2%, a fim de facilitar a manipulação transretal. A vulva e a região perineal foram lavadas com água e secas com papel toalha. Cada ovário foi localizado por palpação retal e direcionado para o transdutor (5 MHz, probe transvaginal, Aloka SSD 500). Após a identificação dos folículos presentes foi realizada a punção dos folículos com diâmetro superior a 3 mm. Os oócitos foram coletados em tubo cônico de 50 mL (Marca BD) com auxílio de bomba vácuo (VMAR-5100, Cook Veterinary Products, Austrália) a uma pressão de 80 mmHg. Após o procedimento de OPU, os oócitos foram lavados em membrana filtrante com solução tamponada de fosfato (PBS, Nutricell), mantida a temperatura de 38°C. Em seguida, foi realizada a contagem e classificação dos oócitos viáveis, segundo o Goodhand et al. (1999). Os oócitos selecionados como viáveis foram enviados para o laboratório para a realização dos procedimentos referentes às etapas de

maturação, fecundação e cultura *in vitro*.

5.3.5 Produção *in vitro* dos embriões Para a realização do procedimento de maturação *in vitro* (MIV), grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para placas de Petri (35x10 mm) em gotas de 100 µL meio base de maturação (MM-b), constituído de TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, USA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/ml de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V, Bioniche Inc., Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin® Bioniche Inc., Canadá) e 10% de SFB (Nutricell Ltda, Brasil). As gotas foram dispostas sob óleo mineral. A incubação foi realizada em estufa de cultura (Forma Scientific, USA), em atmosfera úmida, com 5% CO₂ e a 39°C por um período de 24 horas. No procedimento de fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada a seleção espermática pela técnica de gradiente de Percoll. Desta forma, em um tubo de 15mL foi adicionado o volume de 1mL de Percoll a 45% e no fundo do tubo, 1mL de Percoll a 90%. Os tubos foram colocados em estufa de CO₂, durante 1 hora. Após esse período, uma palheta de sêmen de touro escolhido para o acasalamento, foi descongelada a 37°C por 30 segundos. A amostra de sêmen foi cuidadosamente, depositada na superfície da solução de Percoll a 45% e o tubo foi submetido à centrifugação a 700 x g, por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o “pellet” ressuspendido em 50 µL de meio TALP-FERT (acrescido de 20 µg/mL de heparina e PHE: 2 mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer (5µL da suspensão de espermatozóides em 95 µL de solução formol-salina). A motilidade e o vigor dos espermatozóides foram avaliados por microscopia óptica. Os oócitos foram co-incubados com espermatozóides (concentração final de 1×10^6 spztz/100µL), em gotas de meio TALP-FERT, em atmosfera úmida a 5% de CO₂ a 39°C durante 20 horas. Na cultura *in vitro* (CIV) as células do *cumulus* foram removidas parcialmente, através de sucessivas pipetagens, e os prováveis zigotos foram transferidos para gotas de meio de

cultura SOF-m (modificado), onde permaneceram durante as primeiras 52 horas. Ao final desse período, ou seja, 72 horas pós-fecundação (PF) a clivagem foi verificada e 50% de meio fresco foi adicionado às gotas. Este procedimento foi repetido com 120 horas PF. A cultura dos embriões foi realizada sob as mesmas condições descritas para a MIV e FIV. O desenvolvimento embrionário foi monitorado às 72, 144 e 168 horas pós-fecundação. No dia 7 (D7) os embriões resultantes da produção *in vitro* foram classificados segundo estágio de desenvolvimento embrionário em blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) ou blastocisto eclodido (Be). Além do estágio de desenvolvimento, os embriões foram classificados segundo a qualidade em embriões de grau I (qualidade excelente), II (qualidade mediana) e III (qualidade ruim). Em seguida, apenas os embriões de grau I, foram envasados e transportados à temperatura de 36°C até o local onde foram transferidos para as receptoras.

5.3.6 Avaliação do corpo lúteo por ultrassonografia. No dia 5 (D5) as receptoras foram avaliadas por ultrassonografia para a determinação do tamanho do CL. A imagem do CL de cada animal foi congelada no monitor do ultrassom e em seguida foi mensurada a área de tecido luteal (cm²) usando o calíper interno do equipamento Aloka SSD 500. As medidas foram realizadas segundo Siqueira et al., 2009. Os animais que não tinham presença de CL no D5, que supostamente não ovularam, foram descartados do experimento.

5.3.7 Transferência de embriões em tempo fixo. As receptoras foram contidas e receberam anestesia epidural com 4 mL de Lidocaína 2% sem vasoconstritor. Os embriões foram depositados no terço anterior do corno ipsilateral ao CL por via transcervical. Os embriões foram transferidos por apenas um veterinário em todo o experimento.

5.3.8 Coleta de sangue e processamento de amostras. As coletas de sangue foram realizadas no D5 e no D7, considerando o dia esperado para o estro

como D0. Aproximadamente 4 mL de sangue foi coletado por venopunção da veia caudal mediana. O sangue foi cuidadosamente desprezado em um tubo de vidro com vácuo (Vacutainer Systems, Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo como anticoagulante o ácido tetracético etilenediamine de sódio (EDTA). Em seguida, o tubo foi invertido lentamente repetidas vezes até que fosse suficientemente homogeneizado com o EDTA e acondicionados a 4°C até que fossem centrifugados. As amostras foram submetidas à centrifugação (FANEM, Modelo Baby I 206 BL) a 3000 x g, durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação o plasma foi removido e armazenado em microtubos e foi acondicionado a -20° C até a realização da técnica de radioimunoensaio.

5.3.9 Radioimunoensaio para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona. As concentrações de P4 foram mensuradas pela Técnica de Radioimunoensaio; utilizando kits comerciais (Count-a-Count®, DPC, Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, EUA). Para a avaliação das amostras foram realizados três ensaios. Foram utilizadas amostras de referência contendo concentrações altas (CA) e baixas (CB) de P4. Para a referência CA, os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 1,60%; 1,56% e 1,39%. Para a referência CB, os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 0,10%; 0,05% e 0,03%. O coeficiente inter-ensaio foi 5,30% para a CA e 2,95% para a CB. O limite de sensibilidade para os ensaios 1, 2 e 3 foram 0,005 ng/mL, 0,005 ng/mL e 0,008 ng/mL, respectivamente.

5.3.10 Diagnóstico de Gestação. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a TETF através de exame ultrassonográfico (Aparelho Aloka Ultrasound Diagnostic Equipament, Modelo SSD-500, Tokyo-Japão) com transdutor linear de 5MHz. As fêmeas foram classificadas em prenhe (presença do feto) ou não prenhe (ausência do feto).

5.3.11 Análise Estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2003; SAS Institute, Cary, NC, USA). As variáveis respostas contínuas analisadas foram: área do corpo lúteo no D5; concentração de P4 no D5; concentração de progesterona no D7; diferença da concentração de P4 entre D7 e D5 (DIF 7-5) e razão da concentração de P4 entre D7 e D5 ($D7 / D5$). As variáveis foram testadas quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data analysis” do SAS. Os valores das variáveis foram testados quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS e quando necessário foram transformados conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. As médias foram analisadas pelo Glimmix, no qual o modelo inicial para todas as variáveis incluiu os efeitos de presença de estro, replicata, prenhez e a interação replicata x prenhez. Para a obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram removidas através do critério estatístico de Wald utilizando como critério de remoção o valor de $P > 0,20$. As transformações realizadas e o modelo estatístico final para cada variável estão representados na Tabela 3. No modelo final para todas as variáveis inclui-se os efeitos presença de estro, replicata e prenhez. As novilhas foram classificadas em quartis (Q) segundo a concentração de P4 no D7. A taxa de prenhez e o risco ajustado (intervalo de confiança) para os quartis Q1, Q2, Q3 e Q4 foi analisada. Todos os resultados serão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão não transformados.

Tabela 3. Variáveis analisadas segundo o modelo estatístico inicial que inclui presença de estro, replicata, prenhez e a interação replicata*pregnhez; transformação de dados e modelo estatístico final para cada variável avaliada - Experimento 3

VARIÁVEIS ANALISADAS	MODELO ESTATÍSTICO INICIAL	TRANSFORMAÇÃO DE DADOS	MODELO ESTATÍSTICO FINAL
Área do Corpo Lúteo no D5	Presença de Estro, Replicata, prenhez, replicata*pregnhez	log 10	Presença de Estro, Replicata, pregnhez,
Concentração de P4 no D5	Presença de Estro, Replicata, prenhez, replicata*pregnhez	Raiz Quadrada	Presença de Estro, Replicata, Pregnhez
Concentração de P4 no D7	Presença de Estro, Replicata, prenhez, replicata*pregnhez	Raiz Quadrada	Presença de Estro, Replicata, Pregnhez
DIF 7-5	Presença de Estro, Replicata, prenhez, replicata*pregnhez	Não Transformado	Presença de Estro, Replicata, Pregnhez
D7 / D5	Presença de Estro, Replicata, prenhez, replicata*pregnhez	log 10	Presença de Estro, Replicata, Pregnhez

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO 1

As médias e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona em animais que receberam 0 UI (n=37) ou 300 UI de eCG (n=90) estão representadas na Tabela 4.

Conforme apresentado na Figura 2, nos animais tratados com eCG foram observadas maiores concentrações de P4 no D0 ($0,30 \pm 0,03$ vs. $0,20 \pm 0,02$ ng/mL; $p < 0,05$); D7 ($3,55 \pm 0,17$ vs. $3,16 \pm 0,24$ ng/mL; $p < 0,01$) e D10 ($5,55 \pm 0,22$ vs. $4,75 \pm 0,25$ ng/mL; $p < 0,01$). De fato, Baruselli et al. (2004) verificaram que a administração de 400UI de eCG em fêmeas zebuínas foi eficaz em aumentar as concentrações de P4 sete dias após a ovulação ($4,31$ vs. $2,22$ ng/mL). Também Marques et al. (2003) observaram maior concentração de P4 em primíparas lactantes Nelore x Angus quando o eCG foi aplicado ($8,6$ vs. $6,4$ ng/mL; $p < 0,05$). No presente estudo a concentração média de P4 no D7 em fêmeas tratadas com eCG foi $3,55$ ng/mL. Conforme ilustrado na Figura 3, nos animais tratados com eCG foi observada uma maior DIF 7-5 ($1,66 \pm 0,10$ vs. $1,23 \pm 0,17$ ng/mL; $p < 0,01$), DIF 7-3 ($2,96 \pm 0,16$ vs. $2,37 \pm 0,22$ ng/mL; $p < 0,01$); DIF 10-3 ($4,97 \pm 0,22$ vs. $3,94 \pm 0,23$ ng/mL; $p < 0,01$) e DIF 10-5 ($3,68 \pm 0,17$ vs. $2,79 \pm 0,17$ ng/mL; $p < 0,01$). Observou-se que animais tratados com eCG, além de apresentarem maiores concentrações de P4 no D0, D7 e D10 também tiveram um aumento mais acentuado na produção de progesterona entre os dias 3, 5, 7 e 10. Conforme representado na Figura 4, a amplitude do aumento das concentrações de P4 foi maior nos animais tratados com eCG sendo D7 / D3 ($5,55 \pm 0,22$ vs. $4,79 \pm 0,28$ ng/mL; $p \leq 0,05$) e D10 / D3 ($8,82 \pm 0,37$ vs. $7,39 \pm 0,46$ ng/mL; $p \leq 0,05$). Conforme relatado por outros autores a utilização da eCG na remoção do dispositivo estimula o crescimento folicular (SÁ FILHO et al., 2004), aumenta a taxa de ovulação (SÁ FILHO et al., 2004; BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2005) e a concentração de progesterona no diestro, subsequente à IATF em vacas de corte (STEWART e ALLEN, 1981). De fato, no presente estudo observou-se que vacas tratadas

com eCG apresentam maiores concentrações de P4 no diestro, subsequente à IATF, especificamente no D7 e D10.

Tabela 4. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada - Experimento 1

Variáveis	sem eCG (n=37)	com eCG (n=90)	Valor de p
	Média ± Erro padrão	Média ± Erro padrão	
Concentração de P4 no D0	0,2072 ± 0,0245^b	0,3081 ± 0,0325^a	0,03
Concentração de P4 no D3	0,6969 ± 0,0576	0,7036 ± 0,0357	0,12
Concentração de P4 no D5	1,9595 ± 0,1389	1,9110 ± 0,0996	0,74
Concentração de P4 no D7	3,1600 ± 0,2406^B	3,5566 ± 0,1734^A	0,001
Concentração de P4 no D10	4,7535 ± 0,2562^B	5,5571 ± 0,2280^A	0,004
DIF 5-3	1,2461 ± 0,0969	1,1819 ± 0,0705	0,15
DIF 7-5	1,2315 ± 0,1702^B	1,6666 ± 0,1083^A	0,001
DIF 7-3	2,3785 ± 0,2201^B	2,9645 ± 0,1623^A	<0,001
DIF 10-3	3,9468 ± 0,2356^B	4,9702 ± 0,2295^A	0,0008
DIF 10 -5	2,7951 ± 0,1753^B	3,6898 ± 0,1738^A	0,002
DIF 10 -7	1,5282 ± 0,1808	2,0921 ± 0,1608	0,13
D5 / D3	2,8157 ± 0,1352	2,8462 ± 0,0961	0,46
D7 / D5	1,7188 ± 0,0947	2,0136 ± 0,0668	0,13
D7 / D3	4,7973 ± 0,2830^b	5,5516 ± 0,2240^a	0,05
D10 / D3	7,3986 ± 0,4698^b	8,8203 ± 0,3783^a	0,04

^{a,b}Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B}Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

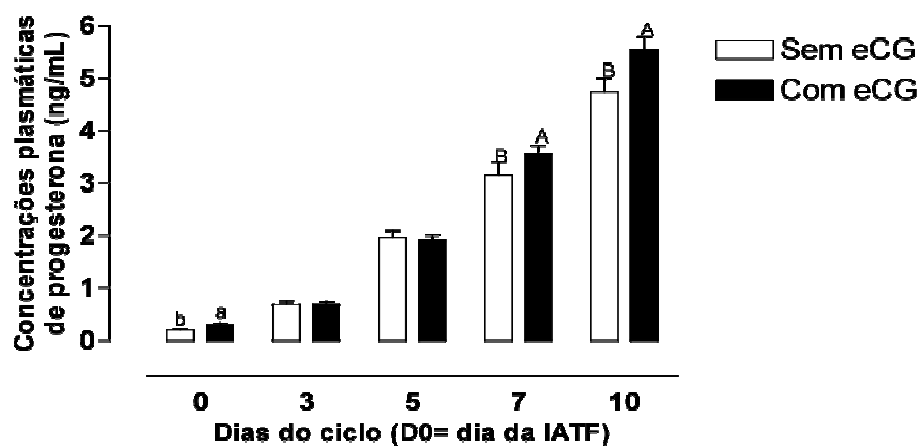


Figura 2. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D0, D3, D5, D7 e D10 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

^{a,b}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

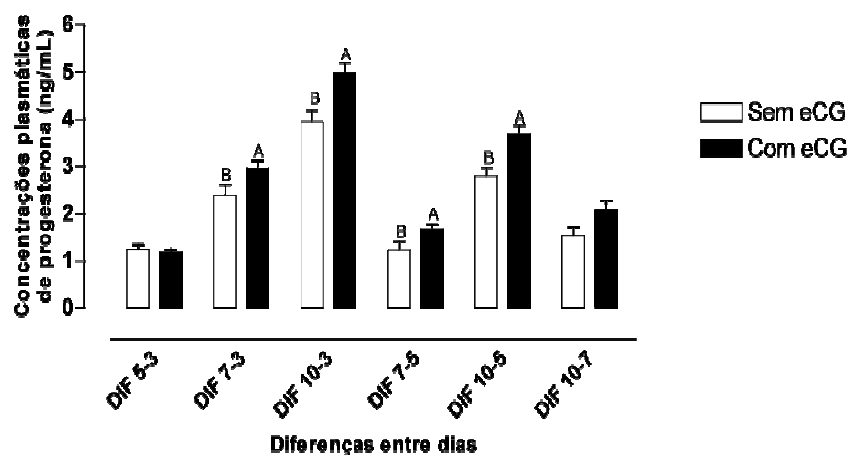


Figura 3. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (DIF 5-3), D7 e D3 (DIF 7-3), D10 e D3 (DIF 10-3), D7 e D5 (DIF 7-5), D10 e D5 (DIF 10-5) e o D10 e D7 (DIF10-7), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

^{A,B} Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

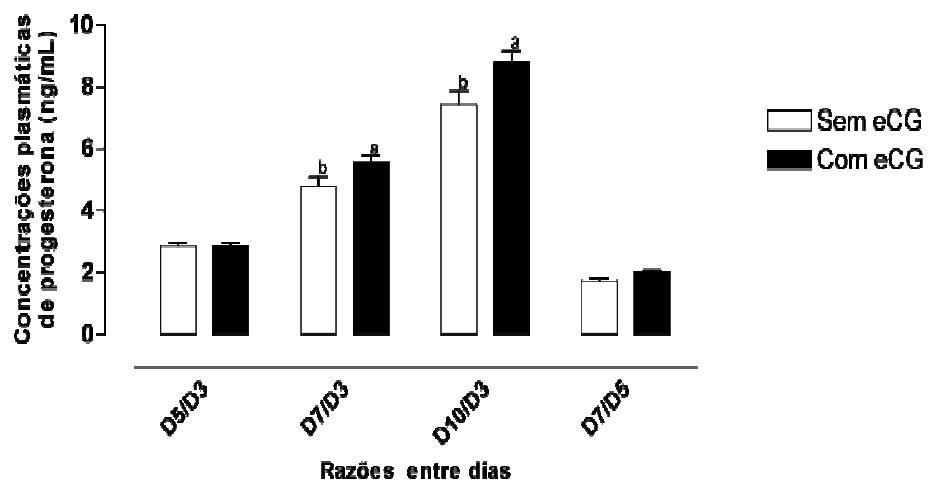


Figura 4. Razões médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (D5 / D3), D7 e D3 (D7 / D3), D10 e D3 (D10 / D3) e D7 e D5 (D7 / D5), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas tratadas com 0UI (n=37) ou 300UI de eCG (n=90) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

^{a,b}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

Embora a concentração de P4 tenha sido incrementada de maneira evidente em fêmeas tratadas com eCG, tal evento fisiológico não promoveu um incremento nas taxas de concepção que foram de 27,0% no grupo 0UI de eCG (10/37) e de 38,9% (35/90) para as fêmeas tratadas com 300UI de eCG ($p=0,86$). De maneira controversa, Penteado et al. (2004) verificaram que a aplicação de 400UI de eCG é eficiente para aumentar a taxa de concepção em protocolos de IATF. Resultado semelhante foi encontrado por Marques et al. (2005) em novilhas Nelore tratadas com 400UI de eCG mostrando aumento na taxa de prenhez (sem eCG – 15,7% vs. com eCG 34,9%). Meneghetti et al. (2006) avaliaram a administração de 300 ou 400UI de eCG ao final do protocolo (momento da retirada dos dispositivos de P4) de IATF em vacas Nelore paridas e concluíram que a utilização de 400UI de eCG aumentou a taxa de prenhez em relação ao grupo controle (54,5% vs. 41,5%). Além disso, Baruselli et al. (2004) observaram uma interação entre a eCG e o escore de condição corporal (ECC) em vacas de corte. Vacas com pior ECC, ou seja, menor ou igual a 3, apresentaram maior taxa de concepção quando o eCG foi utilizado. Neste estudo, vacas com ECC de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 apresentaram taxas de concepção de 22,7%; 42,8%; 53,9%; 52,1% e 69,6% quando não receberam eCG, e de 47,6%; 56,9%; 58,4%; 51,7% e 63,8% quando receberam eCG. No presente estudo, as fêmeas utilizadas apresentaram um ECC variando de 2,5 a 3,5; em média de 3. Possivelmente, o efeito da eCG não tenha sido evidenciado pelo número pequeno de animais utilizados.

As concentrações plasmáticas de P4 foram comparadas entre fêmeas não prenhes e prenhes. As médias e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona em animais prenhes ($n=45$) e não prenhes ($n=82$) estão representadas na Tabela 5. Não foi observada diferença na concentração plasmática de P4 quando se comparou fêmeas não prenhes com prenhes no D0, D3, D5, D7 e D10, conforme representado na Figura 5.

As diferenças das concentrações de P4 estão representadas na Figura 6, não houve diferença significativa entre fêmeas prenhes e não prenhes. As

razões das concentrações de P4 estão representadas na Figura 7, e não foi observada diferença entre os diferentes grupos. O efeito da concentração de P4 após a IATF na taxa de concepção tem sido bastante estudado, contudo os resultados são bastante controversos em fêmeas bovinas de corte e leite (HENRICKS et al., 1971; MANN e LAMMING, 1999; MANN et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004; McNEIL et al., 2006; STARBUCK et al., 2006; DEMÊTRIO et al., 2007). A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária. A P4 controla mudanças no útero e ainda promove o crescimento embrionário (GEISERT et al., 1992), estando relacionada com o reconhecimento materno da gestação (DAY e BRIDGES, 2006). No presente estudo, não houve efeito das concentrações de P4 no período pós-ovulatório nas taxas de concepção.

Tabela 5. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas prenhes (n=45) ou não prenhes (n=82), tratadas com 0UI ou 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada - Experimento 1

Variáveis	Não prenhe		Valor de p
	Prenhe (n=45)	(n=82)	
	Média ± Erro padrão	Média ± Erro padrão	
Concentração de P4 no D0	0,2465 ± 0,0424	0,2707 ± 0,0250	0,39
Concentração de P4 no D3	0,6253 ± 0,0343	0,7417 ± 0,0422	0,74
Concentração de P4 no D5	1,7173 ± 0,0933	2,0308 ± 0,1120	0,67
Concentração de P4 no D7	3,2514 ± 0,2160	3,5492 ± 0,1841	0,58
Concentração de P4 no D10	5,2756 ± 0,3130	5,3306 ± 0,2167	0,62
DIF 5-3	1,0922 ± 0,0757	1,2585 ± 0,0776	0,50
DIF 7 -5	1,5556 ± 0,1620	1,5365 ± 0,1118	0,60
DIF 7 -3	2,6337 ± 0,1963	2,8882 ± 0,1760	0,87
DIF 10 -3	4,6579 ± 0,3005	4,6550 ± 0,2220	0,64
DIF 10 - 5	3,4338 ± 0,2387	3,4135 ± 0,1660	0,95
DIF 10 -7	1,9852 ± 0,2351	1,8962 ± 0,1474	0,74
D5 / D3	2,7825 ± 0,1166	2,8675 ± 0,1021	0,84
D7 / D5	1,9577 ± 0,0909	1,9184 ± 0,0707	0,98
D7 / D3	5,3197 ± 0,2887	5,3555 ± 0,2311	0,90
D10 / D3	8,6742 ± 0,4595	8,2573 ± 0,3949	0,57

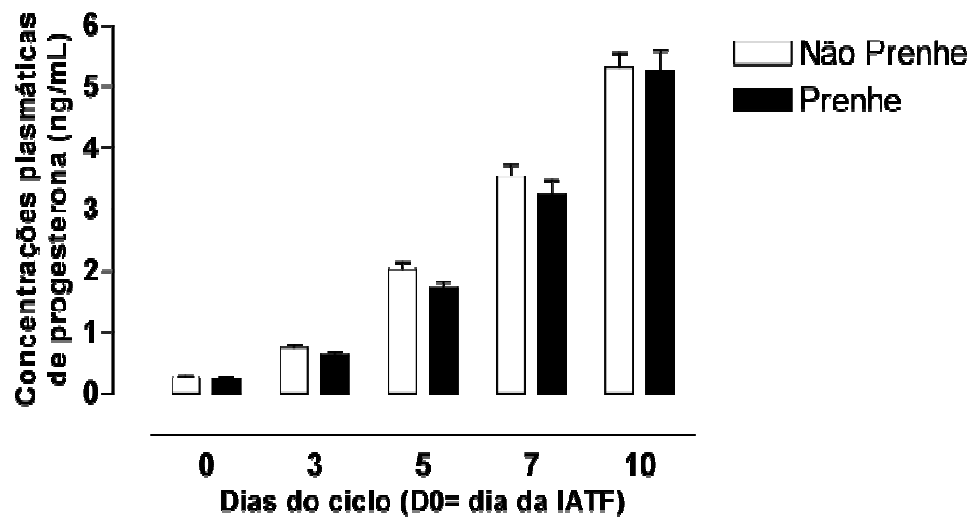


Figura 5. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D0, D3, D5, D7 e D10 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

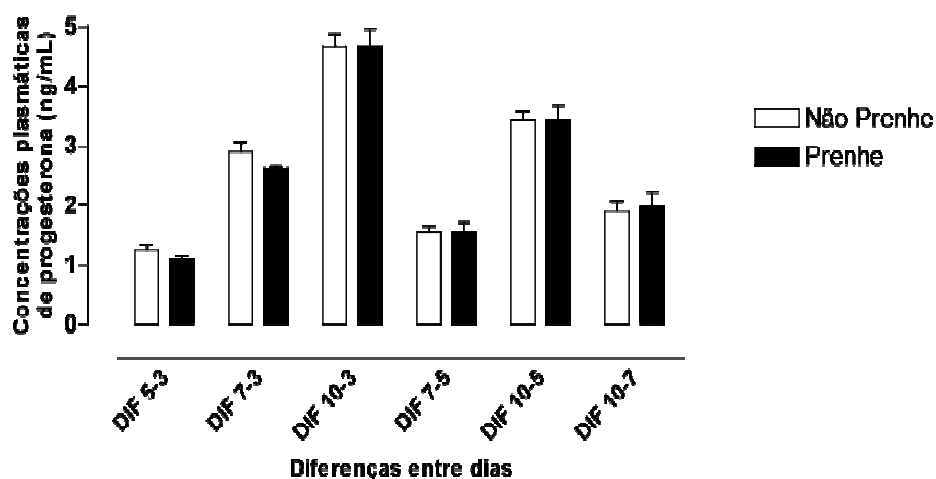


Figura 6. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (DIF 5-3), D7 e D3 (DIF 7-3), D10 e D3 (DIF 10-3), D7 e D5 (DIF 7-5), D10 e D5 (DIF 10-5) e o D10 e D7 (DIF10-7), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

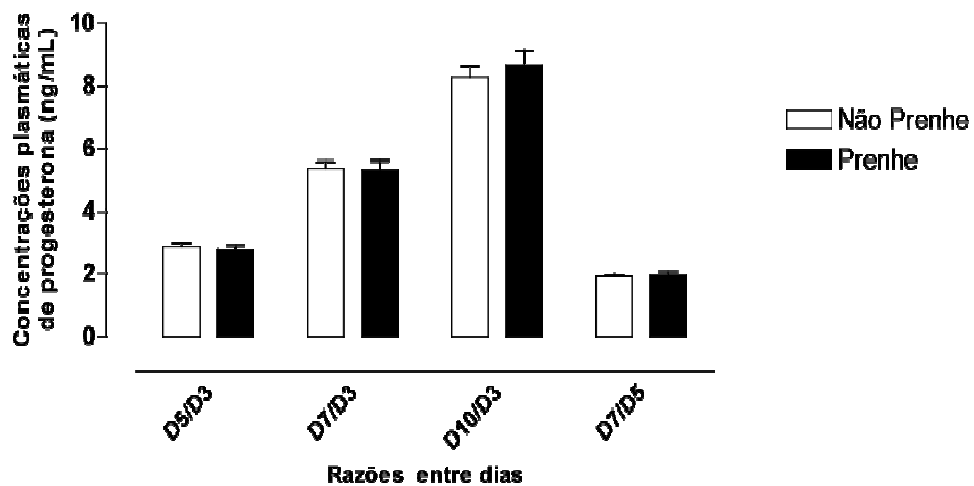


Figura 7. Razões médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (D5 / D3), D7 e D3 (D7 / D3), D10 e D3 (D10 / D3) e D7 e D5 (D7 / D5), sendo D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=82) e prenhes (n=45) tratadas ou não com eCG, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 1

6.2 EXPERIMENTO 2

As médias e erro padrão das variáveis analisadas estão representadas na Tabela 6. Conforme apresentado na Figura 8, não se observou diferença significativa nas concentrações plasmáticas de P4 para as fêmeas não prenhes e prenhes no D3, D7 e D12. Foi observado no D5 maiores concentrações de P4 em fêmeas não prenhes do que nas prenhes ($1,82 \pm 0,21$ vs. $1,47 \pm 0,09$ ng/mL; $p < 0,05$). Entretanto, maiores concentrações de P4 foram observadas em fêmeas prenhes no D17 ($6,07 \pm 0,30$ vs. $2,38 \pm 0,43$ ng/mL; $p < 0,01$). Não se observou diferenças nas concentrações de P4 entre fêmeas não prenhes e prenhes no D3 ($0,64 \pm 0,05$ vs. $0,55 \pm 0,03$ ng/mL, respectivamente), D7 ($2,89 \pm 0,25$ vs. $3,00 \pm 0,25$ ng/mL, respectivamente) e D12 ($5,05 \pm 0,33$ vs. $5,29 \pm 0,35$ ng/mL, respectivamente). Em estudo recente, Dias (2007) sincronizou novilhas Nelore com um protocolo de IATF (dispositivo intravaginal de P4 por 9 dias) com aplicação de PGF2 α no dia 7 e concluiu que no dia 7 pós-IA não houve efeito da concentração sérica de P4 na taxa de prenhez.

Conforme ilustrado na Figura 9, não foi observada diferença significativa entre fêmeas não prenhes e prenhes para a DIF 5-3 ($0,98 \pm 0,09$ vs. $0,91 \pm 0,08$ ng/mL), DIF 7-5 ($1,13 \pm 0,21$ vs. $1,52 \pm 0,19$ ng/mL), DIF 7-3 ($2,14 \pm 0,26$ vs. $2,45 \pm 0,23$ ng/mL), DIF 12-3 ($4,52 \pm 0,30$ vs. $4,81 \pm 0,35$ ng/mL) e DIF 12-7 ($2,21 \pm 0,21$ vs. $2,48 \pm 0,34$ ng/mL). Entretanto, houve diferença significativa entre fêmeas prenhes e não prenhes na DIF 17-12 ($0,47 \pm 0,36$ vs. $-2,42 \pm 0,61$ ng/mL respectivamente, $p < 0,01$). Esses valores ilustram que os animais não prenhes tiveram a luteólise promovida no D17, enquanto que as fêmeas prenhes mantiveram o corpo lúteo.

Segundo Viana et al. (2000) o ciclo estral de animais zebuínos apresenta variação na concentração plasmática de P4, sendo que do dia 0 (dia do cio) ao 4º dia do ciclo a concentração de P4 foi baixa. Após este período, elevou-se atingindo uma concentração máxima entre o 9º e o 12º dia, retornando às concentrações basais em torno do 18º dia do ciclo estral.

Não foram observadas diferenças entre fêmeas não prenhes e prenhes

para as razões D5 / D3 ($2,67 \pm 0,30$ vs. $0,17 \pm 0,35$ ng/mL); D7 / D5 ($1,84 \pm 0,13$ vs. $2,07 \pm 0,13$ ng/mL), D7 / D3 ($4,66 \pm 0,43$ vs. $5,40 \pm 0,42$ ng/mL); D12 / D3 ($8,79 \pm 0,80$ vs. $9,82 \pm 0,78$ ng/mL); D12 / D7 ($1,93 \pm 0,11$ vs. $1,96 \pm 0,12$ ng/mL) e D12 / D17 ($1,93 \pm 0,11$ vs. $1,96 \pm 0,12$ ng/mL). Entretanto, no presente estudo foi observada diferença significativa entre D12 / D5 entre fêmeas prenhes e não prenhes ($4,08 \pm 0,32$ vs. $3,34 \pm 0,22$ ng/mL respectivamente; $p < 0,05$). Nas fêmeas prenhes houve um aumento na produção de P4 maior que nas fêmeas não prenhes entre o D12 e o D5.

O efeito da concentração de P4 pós-IA na taxa de concepção tem sido bastante estudado, mas os resultados são variáveis em gado de leite e corte (HENRICKS et al, 1971; MANN e LAMMING, 1999; MANN et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004; McNEIL et al., 2006; STARBUCK et al., 2006; DEMÉTRIO et al, 2007).

Tabela 6. Média e erro padrão das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) ou prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas, dados apresentados da forma não transformada - Experimento 2

Variáveis	NÃO PRENHE (n=23)	PRENHE (n=25)	Valor de p
	Média ± Erro padrão	Média ± Erro padrão	
Concentração de P4 no D3	0,6471 ± 0,0525	0,5566 ± 0,0376	0,1624
Concentração de P4 no D5	1,8263 ± 0,2172^a	1,4737 ± 0,09676^b	0,0289
Concentração de P4 no D7	2,8908 ± 0,2562	3,0034 ± 0,2564	0,7576
Concentração de P4 no D12	5,0572 ± 0,3335	5,2945 ± 0,3506	0,6283
Concentração de P4 no D17	2,3822 ± 0,4300^B	6,0728 ± 0,3089^A	<,0001
DIF 5-3	0,9809 ± 0,0984	0,9175 ± 0,0852	0,3213
DIF 7-5	1,1334 ± 0,2155	1,5286 ± 0,1992	0,1963
DIF 7 -3	2,1431 ± 0,2646	2,4534 ± 0,2373	0,2415
DIF 12-3	4,5290 ± 0,3079	4,8156 ± 0,3561	0,5505
DIF 12-5	3,4750 ± 0,2798	3,9256 ± 0,3449	0,3195
DIF 12-7	2,2177 ± 0,2161	2,4895 ± 0,3474	0,5101
DIF 17-12	-2,4244 ± 0,6117^B	0,4792 ± 0,3637^A	0,0002
D5 / D3	2,6714 ± 0,1736	2,6308 ± 0,1568	0,3359
D7 / D5	1,8482 ± 0,1370	2,0743 ± 0,1329	0,0658
D7 / D3	4,6631 ± 0,4303	5,4063 ± 0,4281	0,1218
D12 / D3	8,7942 ± 0,8008	9,8227 ± 0,7800	0,4570
D12 / D5	3,3471 ± 0,2241^B	4,0862 ± 0,3297^A	0,0320
D12 / D7	1,9327 ± 0,1166	1,9613 ± 0,1261	0,9509

^{a,b} Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B} Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

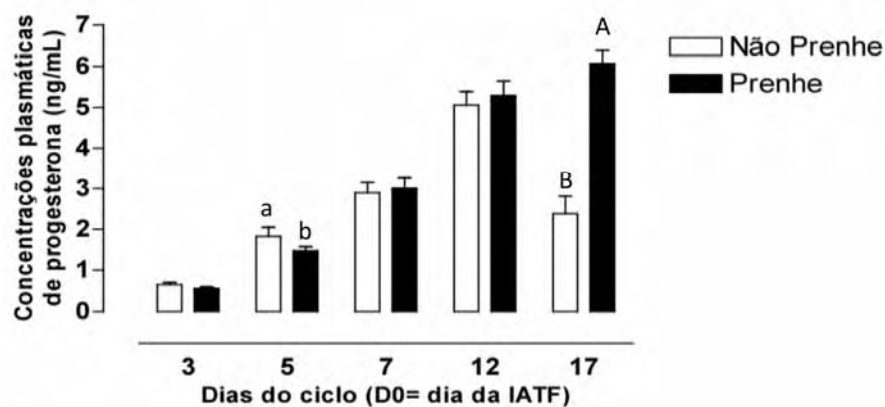


Figura 8. Concentrações médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D3, D5, D7, D12 e D17 (D0= dia da IATF) em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) e prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 2

^{a,b}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

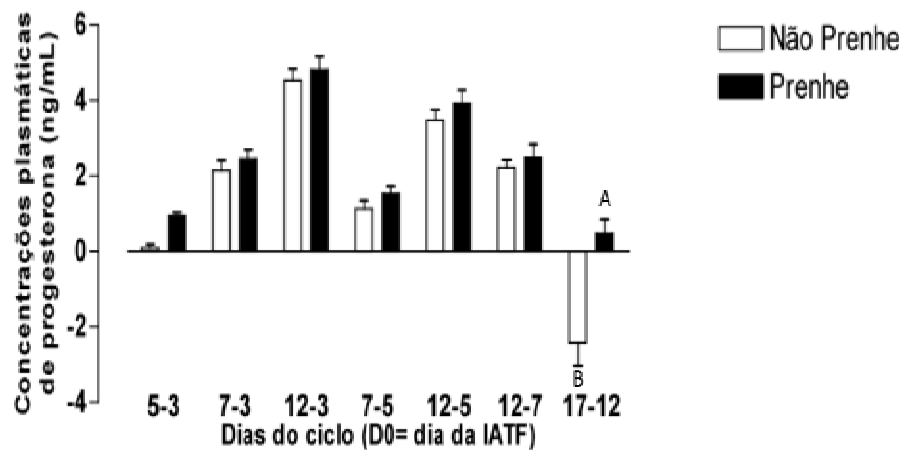


Figura 9. Diferenças médias e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) entre o D5 e D3 (5-3), D7 e D3 (7-3), D12 e D3 (12-3), D7 e D5 (7-5), D12 e D5 (12-5), D12 e D7 (DIF12-7) e D17 e D12 (17-12), sendo o D0 o dia da IATF, em fêmeas zebuínas não prenhes (n=23) e prenhes (n=25), tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, estão apresentados os resultados não transformados - Experimento 2

^{A,B}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

6.3 EXPERIMENTO 3

Inicialmente as variáveis foram analisadas para os grupos das fêmeas que apresentaram ausência ou presença de estro, e estão representadas na Tabela 7 e Figura 10. Verificou-se que a área do corpo lúteo não diferiu na ausência ou presença de estro ($21,59 \pm 1,04$ vs. $22,23 \pm 0,64$ cm³, respectivamente), assim como a concentração de P4 no D5 ($1,66 \pm 0,14$ vs. $1,67 \pm 0,08$ ng/mL, respectivamente). Entretanto, as fêmeas que não apresentaram estro comparadas as que apresentaram estro tiveram maiores concentrações de P4 no D7 ($2,80 \pm 0,25$ vs. $2,46 \pm 0,12$ ng/mL, respectivamente; $p \leq 0,01$), DIF 7-5 ($1,46 \pm 0,26$ vs. $0,82 \pm 0,11$ ng/mL, respectivamente; $p < 0,01$) e D7 / D5 ($2,10 \pm 0,19$ vs. $1,61 \pm 0,06$ ng/mL, respectivamente; $p < 0,01$).

Esperava-se que fêmeas que apresentaram a presença de estro tivessem maior área de corpo lúteo, concentração de P4 no D5, D7, DIF 7-5 e D7/D5. Estes resultados encontrados não eram os esperados considerando que no referido experimento a taxa de prenhez foi maior em receptoras que apresentaram comportamento de estro comparadas as que não apresentaram estro (77,4% vs. 64,6%; $p < 0,05$). Vasconcelos et al. (2001) verificaram que um folículo ovulatório com maior diâmetro apresenta maior capacidade de produção de estradiol (E2) e que o tamanho deste folículo é positivamente correlacionado com o tamanho do CL formado a partir de sua ovulação e com a capacidade deste CL de produzir P4. A ocorrência do estro antecedendo a IATF foi associada com folículos de diâmetro maiores, maior concentração plasmática de progesterona durante a fase luteal e maior taxa de concepção (SÁ FILHO et al., 2011).

Tabela 7. Média e erro padrão da área do corpo lúteo no D5 (cm³) e concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas segundo a ausência (n=66) ou presença de estro (n=170), dados apresentados da forma não transformada - Experimento 3

Variáveis	Ausência de estro (n=66)	Presença de estro (n=170)	Valor de p
	Média ± Erro padrão	Média ± Erro padrão	
Área do Corpo Lúteo no D5 (cm ³)	21.5909 ± 1.0455	22.2352 ± 0.6471	0.8905
Concentração de P4 no D5	1,6625 ± 0,1483	1,6721 ± 0,0829	0.7844
Concentração de P4 no D7	2,8064 ± 0,2535^A	2,4682 ± 0,1293^B	0.0160
DIF 7 - 5	1,4675 ± 0,2642^A	0,8275 ± 0,1103^B	0.0002
D7 / D5	2,1027 ± 1,9138^A	1,6164 ± 0,0698^B	<.0001

^{A,B}Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

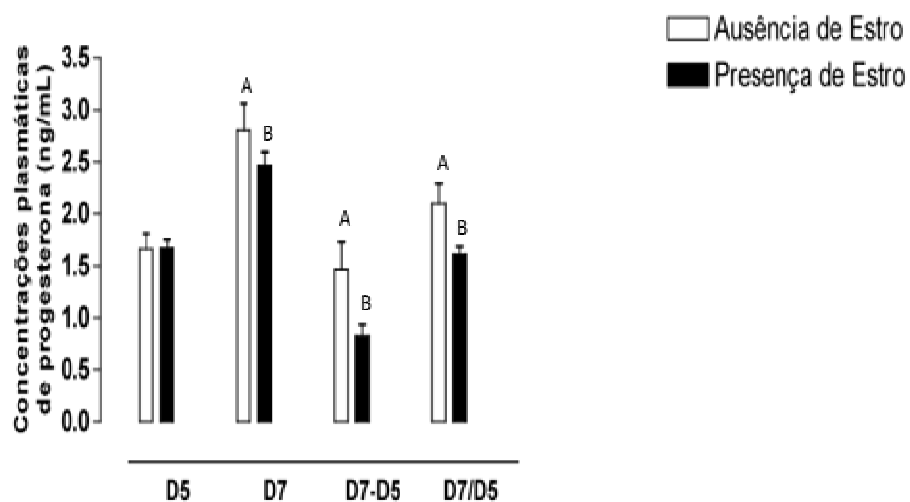


Figura 10. Valores médios e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D5, D7, a diferença entre D7 e D5 (D7-D5) e a razão entre D7 e D5 (D7 / D5), considerando D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras de embriões que tiveram ausência (n=66) ou presença (n=170) de estro

^{A,B} Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

A taxa de prenhez geral no experimento para a TETF foi 58,05% (137/236). As variáveis analisadas para os grupos das fêmeas não prenhes e prenhes estão representadas na Tabela 8 e Figura 11. As concentrações de P4 não diferiram no D5 para receptoras prenhes e não prenhes ($1,73 \pm 0,09$ vs. $1,58 \pm 0,11$ ng/mL., respectivamente; $p = 0,4106$). As concentrações de P4 diferiram de maneira altamente significativa no D7 para receptoras prenhes e não prenhes ($2,80 \pm 0,14$ vs. $2,21 \pm 0,18$ ng/mL respectivamente; $p < 0,05$). A diferença na concentração de P4 do D7 e do D5 (DIF 7-5) foi significativa para receptoras prenhes e não prenhes ($1,14 \pm 0,13$ vs. $0,82 \pm 0,18$ ng/mL respectivamente; $p = 0,1264$). A razão da concentração de P4 do D5 e do D7 foi maior para receptoras prenhes e não prenhes ($1,87 \pm 0,10$ vs. $1,58 \pm 0,10$ respectivamente; $p \leq 0,01$). Dessa forma, sugere-se que há um papel importante desenvolvido pela P4 no desenvolvimento embrionário precoce, mais precisamente dentro da primeira semana de gestação. De fato, Remsen et al. (1982) verificaram uma correlação positiva entre a concentração de progesterona no dia da ovulação e a subsequente taxa de gestação, em um estudo com 223 receptoras de embriões bovinos.

Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo diferem dos relatados por Demétrio et al. (2007) quando verificaram que a probabilidade de concepção de animais que receberam transferência de embriões no dia 7 pós-estro não foi afetada pela concentração plasmática de P4 medida no mesmo dia. Assim como Vasconcelos et al. (2006) que concluíram em seus estudos que a concentração de progesterona plasmática circulante não influencia na taxa de gestação e na perda embrionária.

A concentração de progesterona plasmática pode influenciar no resultado da prenhez, no entanto, é uma ferramenta de diagnóstico pouco confiável para detectar a ocorrência de morte embrionária ou fetal (HUMBLLOT et al., 1988; PIETERSE et al., 1990). Segundo Spell et al. (2001) e Chagas e Silva et al. (2002) a concentração plasmática de progesterona no dia da transferência do embrião não difere significativamente entre animais que seguiram com a prenhez e que tiveram a mesma interrompida, indicando que

as receptoras com corpo lúteo palpável, níveis de progesterona no dia da TE são parâmetros pobres para a seleção de receptoras capazes de manterem a gestação.

Perry et al. (1991) determinaram com o uso de ultrassonografia transretal, que vacas com corpo lúteo visível apresentam concentração plasmática de progesterona maior que 0,5 ng/mL. Diversos autores tem relatado que a concentração plasmática de progesterona materna inferior a 2 ng/mL no dia da transferência do embrião está associada com a redução nas taxas de gestação (REMSEN et al., 1982). Embora outros estudos não tenham encontrado tal correlação (STUBBINGS e WALTON, 1986; SPELL et al., 2001).

Mann e Lamming (1995) encontraram concentrações de P4 entre os dias 12 e 16, em torno de 5,7 – 12,3 ng/mL nas vacas vazias, e em torno de 4,8 – 10,5 ng/mL em vacas prenhes, afirmando com isso que nem sempre baixas concentrações de P4 acarretam perdas embrionárias, assim como nem sempre altas concentrações de P4 resultam em sucesso nas taxas de prenhez. Portanto, a dosagem de P4 plasmática serve apenas como um indicativo da condição reprodutiva do animal, como a ciclicidade ovariana. A maioria dos pesquisadores considera atividade luteal no zebuíno quando a concentração de P4 está acima de 1 ng/mL (MUKASA-MUGERWA et al., 1991)

A Tabela 8 ilustra as concentrações de progesterona no D7 das receptoras de embrião e o sucesso na concepção.

Tabela 8. Média e erro padrão da área do corpo lúteo no D5 (cm²) e concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300 UI de eCG na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona para as diferentes variáveis analisadas segundo a condição de não prenhe (n=99) ou prenhe (n=137), dados apresentados da forma não transformada - Experimento 3

Variáveis			Valor de p
	Não Prenhe (n=99)	Prenhe (n=137)	
	Média ± Erro padrão	Média ± Erro padrão	
Área do Corpo Lúteo no			0.5594
D5 (cm ³)	21.5050 ± 0.8222	22.4526 ± 0.7375	
Concentração de P4 no D5	1,5838 ± 0,1140	1,7306 ± 0,0940	0.4106
Concentração de P4 no D7	2,2181 ± 0,1834^b	2,8058 ± 0,1488^a	0.0226
DIF 7 -5	0,8202 ± 0,1865	1,1412 ± 0,1321	0.1264
D7 / D5	1,5855 ± 0,1034^B	1,8710 ± 0,1031^A	0.0180

^{a,b}Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B}Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

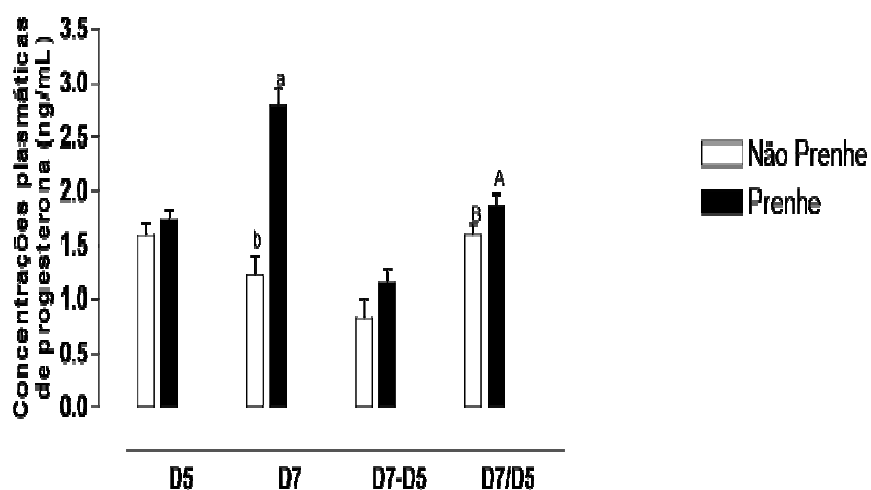


Figura 11. Valores médios e erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) no D5, D7, a diferença entre D7 e D5 (D7-D5) e a razão entre D7 e D5 (D7 / D5), considerando D7 (D0 = dia esperado para o estro, segundo dia após a remoção do dispositivo) em receptoras de embriões prenhes (n=137) e não prenhes (n= 99)

^{a,b}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras minúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$)

^{A,B}Médias $\pm$ erro padrão para a mesma variável, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

Tabela 9. Número de receptoras, concentração de P4 no D7, taxa de prenhez e risco ajustado (intervalo de confiança) para os quartis Q1, Q2, Q3 e Q4 e valor de p em receptoras de embriões (n=236) tratadas com 300UI na retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona, concentração de P4 no D7 apresentada da forma não transformada - Experimento 3

	Progesterona Plasmática no D7				Valor de P
	(ng/mL)				
	Quartil 1	Quartil 2	Quartil 3	Quartil 4	
Número de Receptoras	59	59	59	59	
Concentração de P4 no D7	0,64±0,04	1,70±0,04	2,90±0,07	5,52±0,16	<0,0001
Taxa de prenhez%(n/n)	45,8 (27/59) ^C	52,5 (31/59) ^{BC}	66,1 (39/59) ^{AB}	67,8 (40/59) ^A	0,01
Risco Ajustado	0,21	0,30	0,57		
(Intervalo de confiança)	(0,08-0,58)	(0,12-0,74)	(0,24-1,35)	Ref.	0,01

^{A,B} Médias ± erro padrão na mesma linha, seguidos por letras maiúsculas sobrescritas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$)

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que em fêmeas tratadas com eCG maiores concentrações de P4 não foram observadas no D5 e D7 (D0 = dia da IATF) em fêmeas prenhes após à IATF, entretanto, a taxa de prenhez na TETF de embriões produzidos *in vitro* é positivamente influenciada pela manifestação do comportamento de estro e pelas concentrações de P4 no momento da transferência do embrião.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCZ. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br>>. Acesso em: 10 de jan. 2012.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. 10. ed. São Paulo: Editora FNP, 2012.

ASBIA. **Associação brasileira de inseminação artificial**. 2011. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2012.

BARUSELLI, P.S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.214 (abstract), 2003.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.

BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 52, p. 1451-1463, 2001.

CHAGAS e SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L.; ROBALO SILVA, J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. **Theriogenology**, v.58, p.51–59, 2002.

CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; MORENO, D.; BÓ, G.A.. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v.59, p. 216, 2003.

DAY, M. L. Efeito de estratégias de sincronização da ovulação no desenvolvimento e na concepção. In: CURSO NOVOS ENFOQUES DA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 9., 2005. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2005. CD-ROOM

DAY, M. L.; BRIDGES, A. Impacto das concentrações de hormônios esteróides sobre a fertilidade de bovinos. In: CURSO NOVOS ENFOQUES DA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 10., 2006. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2006. CD-ROOM

DEMETRIO, D.G. et al. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.5073-5082, 2007.

DIAS, C. C. **Avaliação dos efeitos da concentração de progesterona nas respostas ao protocolo de sincronização da ovulação em novilhas Nelore cíclicas**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reprod. Domest. Anim.**, v.43, n.2, p.260-267, 2008.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, n. 2, p.463-468, 1980.

FAVERO, R. J. **Methods and control of beef females**. 1992. 213f. Tese (Ph. D.) – University of Illinois at Urbana – Champaign.

FEDOROFF, N.V. et al. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, v. 327, p. 833-834, 2010.

GARRETT, J.E et al. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **J. Reprod. Fertil**, v. 84, p. 437–446, 1988.

GEISERT, R. D.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. C. Maternal recognition of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 287 – 298, 1992.

GOODHAND, K.L. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v.51, p. 951-961, 1999.

GREEN, M.P.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.88, p.179-189, 2005.

HENRICKS, D.M. et al. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 33, p. 450 – 454, 1971.

HILL, I. D. Reprodução com metas de precocidade marca o programa da Jacarezinho. **Pecuária de corte**, p.19 – 26, 1998.

HUMBLLOT, F. et al. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. **J. Reprod. Fertil**, v.83, n.1, p.215-23, 1988.

HUMBLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the time, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v.56, p.1417-1433, 2001.

KUNZ, T.L. et al. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista CFMV**, v.8, n. 26, p 27-36, 2002.

LOPES, C.N. **Suplementação de gordura protegida na produção de progesterona, momento da luteólise e prenhez em vacas Nelore**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MACHADO, R.S. et al. Metodologia para obtenção de conceito bovino. In: **BOLETIM de pesquisa e desenvolvimento**. v. 19. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2009.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reprod. Dom. Ani.**, v. 34, p. 269 – 274, 1999.

MANN, G. E. et al. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 71 – 79, 2003.

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

MANN, G.E.; FRAY, M.D.; LAMMING, G.E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **Vet. J.**, v.171, p.500-503, 2006.

MARQUES, M. O. et al. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* no período pós-parto. **In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL**, 5., 2003. **Anais...** Huerta Grande, 2003. v. 1, p. 392.

MARQUES, M. O. et al. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Suplemento 1). p. 287, 2005.

MARTIN, I. et al. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. **Reprod. Domest. Anim.**, v.43, p.415-421, 2008.

McNEIL, R.E. et al. Associations between milk progesterone on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1435 – 1441, 2006.

MENEGHETTI, M. et al. Adição de eCG ou remoção do bezerro no final de protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Suplemento 1). p. 392, 2006.

MIHM, M. et al. Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. **Journal Reproduction Fertility**, v. 13, p. 14, 1994.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v.6, n.6, p.636, 1976.

MUKASA-MUGERWA, E.; TEGEGNE, A.; FRANCESCHINI, R. Influence of suckling and continuous cow-calf association on the resumption of post-partum ovarian function in *Bos indicus* cows monitored by plasma progesterone profiles. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.31, n.3, p.241-247, 1991.

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

MUSSARD, M.L. et al. Influence of premature induction of LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. **Biol Reprod**, v. 66, suppl. 1, p. 266, 2002.

MUSSARD, M.L. et al. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominance follicles of early or late maturity. **Biol Reprod**, v. 68, suppl. 1, p. 332, 2003.

MUSSARD, M.L.; BURKE, C.R.; DAY, M.L. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: ANIMAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2003. **Proceedings...**, [S.l.: s.n.], 2003.

NOGUEIRA, M.F.G. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo transfer recipients synchronized with PGF2 α and eCG. **Theriogenology**, v. 61, p. 1283 – 1290, 2004.

PENTEADO, L. et al. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, suppl. 1, p. 223, 2004.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 416p.

PERES, R.F. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n.5, p. 681-9, 2009.

PERRY, R.C. et al. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. **J. Anim. Sci.**, v. 69, n.6, p. 2548-2555, 1991.

PERRY, G.A. et al. Relationship between follicle size pregnancy success. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 102, n. 14, p. 5268 – 5273, 2005.

PERRY, G.A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifer. **J. Ani. Sci.**, v.85, p. 684 – 689, 2007.

PIETERSE, M.C. et al. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. **Vet. Rec.**, v.126, n.22, p.552-4, 1990.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915 – 923, 1995.

REIS, E.L. et al. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.88, 2004.

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

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

ROBINSON, R.S. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**; v.122, p.965-979, 2001.

ROCHE, J.F.; PRENDIVILLE, D.J.; DAVIS, W.D. Calving rate following fixed-time insemination after a 12-day progesterone treatment in dayre cows, beef cows and heifers. **Veterinary Record**, v. 101, n. 21, p. 417-419, 1977.

SÁ FILHO, M.F. et al. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactentes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (suplemento), p. 235, 2004.

SÁ FILHO, M. F. et al. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinarie** v.33, supl.1, p.265, 2005.

SÁ FILHO, O.G. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone or Bos indicus cow II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-221. 2009.

SÁ FILHO, M.F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 129, p. 132-139, 2011.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v. 85, n.11, p.2831-4282, 2002.

SANTOS, J.E.P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p.513-535, 2004.

SARTORI, R. et al. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**. v.60, p. 1319-1330, 2003.

SARTORI, R. et al. 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. et al. Fertilization and early embryonic development in Heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.11, p. 2803-2812, 2002.

SATTERFIELD, M.C.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biol. Reprod.**, v.75, p.289-296, 2006.

SCOT CONSULTORIA. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

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

SONG, G.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Progesterone and interferon-tau regulate cystatin C in the endometrium. **Endocrinology**, v.147, p.3478-3483, 2006.

SPELL, A.R. et al. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.287-297, 2001.

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

SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. **Vet. Rec.**, v.112, p.517-521, 1983.

SREENAN, J.M.; MULVEHILL, P. The application of long and short-term progestagen treatments for oestrus cycle control in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, n. 2, p. 367-369, 1975.

STARBUCK, G. R. et al. Timing of follicular phase events and the postovulatory progesterone rise following synchronization of oestrus in cows. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 103 – 108, 2006.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527-36, 1981.

STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. **Theriogenology**, v.26, n.2, p.145-155, 1986.

THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Systems to alter embryo survival. In: LARGE dairy herd management. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p. 164-175.

VALENTIM, R.; MARQUES, M.O.; CREPALDI, G.A. Efeito do tratamento com FSH na retirada do dispositivo intravaginal de progesterone sobre a taxa de prenhez de primíparas Nelore inseminadas em tempo fixo. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2006. **Anais...** Guarujá: [s.n.], 2008. p. 597 (Supl. 2).

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.131-143, 2000.

VASCONCELOS, J. L. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Effects of synchromate B combined with Ngr. On follicular dynamics and time of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 77, suppl. 1, p. 174, 1994.

VASCONCELOS, J.L. et al.. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307-314, 2001.

VASCONCELOS, J.L. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p.1067-1078, 1999.

VASCONCELOS, J.L. et al. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v.60, n.5, p.795-807, 2003.

VIANA, M.; et al. Alpha-tocopherol concentration in fetal and maternal tissues of pregnant rats supplemented with alpha-tocopherol. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 43, n.2, p.107-112, 1999.

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