

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE, DA
SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA E/OU DA
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA
REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM
VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)**

Rita Cristina Rossetti

Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP
2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE, DA
SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA E/OU DA
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA
REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM
VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)**

Rita Cristina Rossetti

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

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

ARAÇATUBA - SP
2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- R829e Rossetti, Rita Cristina.
Efeito do flunixin meglumine, da somatotropina recombinante bovina e/ou da gonadotrofina coriônica humana na redução da mortalidade embrionária em vacas nelore (*Bos taurus indicus*) / Rita Cristina Rossetti. – Araçatuba: [s.n.], 2010
109 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive
1. Antiinflamatórios 2. Bovinos 3. Corpo lúteo 4. Progesterona

CDD 636.0896

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITO DO FLUNIXIN MEGIUMINE, DA SOMATOTROPINA BOVINA E/OU DA GONADOTROPINA CORIÔNICA HUMANA NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS NELORE (Bos taurus indicus)"

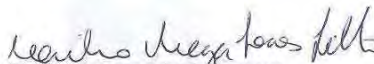
AUTOR: RITA CRISTINA ROSSETTI

ORIENTADOR: Dr.ª CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dr. RUI MACHADO



Dr. CECÍLIO VIEGA SOARES FILHO



Dr.ª CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

DATA DA REALIZAÇÃO: 25 de junho de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Rita Cristina Rossetti – Nascida no dia 26 de janeiro de 1972, no município de Dracena - SP. Cursou até a oitava série no Colégio Luíza Rossa Ribeiro e o ensino médio no Colégio Anglo Cid, ambos na cidade de Dracena - SP. Filha de pecuarista, nascida e criada em contato direto com a pecuária de corte, desde a infância demonstrou afinidade e interesse pelos animais de produção. Em 1990, ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade do Oeste Paulista, sediada na cidade de Presidente Prudente - SP. A graduação foi concluída em 1994. Desde que concluiu seu curso de graduação, administrou as fazendas de gado de corte da família, dedicando-se em especial ao setor de cria. Neste setor, o êxito do manejo geral e reprodutivo dos animais tornou-se essencial para o sucesso da atividade. Nos últimos anos, o setor sucro-alcooleiro, aquecido pela agroenergia, aumentou a competitividade dentro do próprio setor agropecuário, exigindo que a pecuária bovina de corte aumentasse sua produtividade e lucratividade para que se tornasse economicamente viável. Diante de tal contexto econômico, a autora tomou a iniciativa de atualizar e ampliar seus conhecimentos, especialmente na área de Reprodução Animal. Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, na Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba. Durante o Mestrado cursou e foi aprovada em um conjunto de 14 disciplinas. A dissertação de mestrado refere-se ao estudo de estratégias farmacológicas que possam reduzir a mortalidade embrionária em fêmeas bovinas, tema que integra a linha de pesquisa da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, professora da UNESP de Dracena, vinculada a Pós-Graduação em Ciência Animal na UNESP de Araçatuba, responsável pela orientação da presente dissertação.

EPÍGRAFE

“Não há progresso sem mudança. E, quem não consegue mudar a si mesmo, acaba não mudando coisa alguma”. (George Bernard Shaw)

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim...” (Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

“Dedico a todos aqueles que me apoiaram e incentivaram nos momentos mais difíceis deste trajeto, nestes últimos dois anos, em busca do meu objetivo maior, o Mestrado”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por conceber a oportunidade de crescimento pessoal e profissional através da realização deste trabalho, e principalmente, ao fortalecimento em todos os momentos que me senti desmotivada pelo cansaço e obstáculos impostos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, pela oportunidade, confiança, amizade, apoio, paciência, compreensão e pelas suas sábias palavras, que sempre me encorajaram a enfrentar os desafios.

Aos meus pais, por terem me ensinado o valor da palavra EDUCAÇÃO e pelas excelentes oportunidades durante minha formação acadêmica. Obrigada pela confiança depositada em todas as decisões por mim tomadas.

Ao Fernando Henrique, que sempre esteve comigo, incentivando e prezando pelos meus pais e meus empreendimentos, tornando possível meu total empenho e dedicação ao mestrado. Obrigado por dar significado à palavra AMOR.

A minha grande amiga-irmã Patty, pelo incentivo, apoio e ensinamentos em inglês, até então meu completo desconhecido! Graças a você, aceitei esse grande desafio de fazer o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meirelles, Coordenador da Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, pela oportunidade e confiança depositada.

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

Ao Dr. Rui Machado, Pesquisador da EMBRAPA Sudeste de São Carlos/SP, pela grande parceria e colaboração, além da contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de São Paulo-SP, pela contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, pela valiosa colaboração na mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona por radioimunoensaio.

Aos professores da Universidade Estadual Paulista, Campus de Dracena, em especial a Profa. Dra. Flávia Thomaz Verechia Pereira, Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto, Prof. Dr. Ricardo da Fonseca, pela ajuda e amizade.

Aos professores da UNESP de Araçatuba, UNESP de Jaboticabal e UNESP de Botucatu, pelos ensinamentos durante as disciplinas.

Aos alunos de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, José Nélcio S. Sales e Gabriel A. Crepaldi. Agradeço pela grande colaboração, disposição, paciência e ensinamentos na parte experimental.

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

À Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, em especial ao Diogo e Valéria, pela disponibilidade, paciência e gentileza.

Aos alunos de graduação da UNESP de Dracena, em especial ao Alexandre Perdigão, pela parceria e ajuda incondicional na execução deste projeto.

Ao zootecnista, Robson C. Nunes Dinardi, por intermediar a oportunidade de que parte deste projeto fosse realizado junto à Fazenda Guanabara.

Aos queridos amigos da Pós-graduação: Andréa, Amanda, Anne, Pamela, Angélica, Bruna, Brejinho, Camila, Catarina, Dani, Fabrine, Fernando, Heni, Joelson, Luis, Michele, Mili, Natália, Nelo, Paty, Sérgio, Zé Cavalo, Wanderson e Welerson. Obrigada pelos bons momentos.

À Fazenda Jacareúna, em especial ao Sr. Plínio Anderson Gonzalez, pela permissão à utilização dos animais, cordialidade e simpatia durante a estadia na fazenda.

Ao Grupo Grendene, em especial ao Sr. Ilson Ribeiro Correa e ao Sr. José Carlos Gava Filho, pela disponibilidade dos animais, cordialidade e confiança depositada.

Aos funcionários das Fazendas Jacareúna e Guanabara, que foram essenciais para realização deste estudo, pela amizade e pelos momentos de muitas risadas.

À INTERVET, em especial ao Sr. Juliano Kummer, pela confiança depositada na doação de todos os fármacos utilizados no presente estudo. Sua participação foi determinante para tornar possível a execução deste estudo.

Ao médico veterinário da INTERVET, Denis Barbosa Alves Antônio, pela amizade e colaboração no presente estudo.

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) pela concessão de parte do auxílio financeiro.

Aos animais utilizados no presente estudo, pela quantidade de informação disponibilizada.

E a todos que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado, contribuindo no desenvolvimento deste projeto.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 HIPÓTESE.....	24
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	
4.1 Eficiência reprodutiva em bovinos.....	25
4.2 Mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da prenhez.....	28
4.3 Atuação das drogas antiinflamatórias na sobrevivência embrionária.....	31
4.4 Atuação da Somatotropina Recombinante Bovina na sobrevivência embrionária.....	37
4.5 Atuação da Gonadotrofina Coriônica Humana na sobrevivência embrionária.....	42
REFERÊNCIAS.....	48

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE, SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA E/OU GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

RESUMO.....	64
1 JUSTIFICATIVA.....	68
2 MATERIAL E MÉTODO	

2.1 Local do Experimento	71
2.2 Período	71
2.3 Animais	71
2.4 Manejo Sanitário.....	75
2.5 Indução da ovulação.....	75
2.6 Inseminação Artificial.....	77
2.7 Aplicação dos Tratamentos.....	77
2.8 Coleta de Amostras de Sangue.....	79
2.9 Radioimunoensaio para mensuração de Progesterona.....	79
2.10 Diagnóstico de Gestação.....	80
2.11 Análise Estatística	80
3 RESULTADOS	
3.1 Taxas de concepção.....	82
3.2 Concentrações plasmáticas de progesterona no D7.....	84
3.3 Efeito dos tratamentos nas concentrações plasmáticas de progesterona no D16.....	85
3.4 Efeito das concentrações plasmáticas de progesterona no D7 e D16 sobre as taxas de concepção.....	86
4 DISCUSSÃO.	
4.1 Efeito do hCG, bST e FM nas taxas de concepção.....	88
4.2 Efeito do hCG, bST e FM nas concentrações plasmáticas de progesterona.....	93
5 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

%	= porcentagem
μg	= micrograma
μL	= microlitro
<	= menor
≤	= menor ou igual
=	= igual
>	= maior
≥	= maior ou igual
AA	= ácido araquidônico
AINEs	= antiinflamatórios não esteróides
bST	= somatotropina recombinante bovina
Ca ²⁺	= cálcio
CIDR	= dispositivo intravaginal de progesterona
CL	= corpo lúteo
COX	= ciclooxigenase
COX-1	= ciclooxigenase 1
COX-2	= ciclooxigenase 2
D	= dia do ciclo estral
DAG	= diacilglicerol
DIB	= dispositivo intravaginal bovino
DNA	= ácido desoxirribonucléico
ECC	= escore de condição corporal
E ₂	= estradiol
ER	= receptor de estradiol
FM	= flunixin meglumine
<i>g</i>	= força gravitacional
g	= grama
GH	= hormônio de crescimento
GnRH	= hormônio liberador de gonadotrofinas
h	= horas
hCG	= gonadotrofina coriônica humana
IA	= inseminação artificial

IATF	= inseminação artificial em tempo fixo
IFN	= interferon-tau
IGF-1	= fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFPB	= proteínas de ligação do IGF-1
IM	= via intramuscular
IP ₃	= inositol trifosfato
kDa	= quilodaltons
LH	= hormônio luteinizante
mg	= miligrama
mL	= mililitro
n	= número de elementos
°C	= graus Celsius
OT	= ocitocina
OTR	= receptor de ocitocina
p	= nível de significância
P ₄	= progesterona
pg	= picograma
PGF _{2α}	= prostaglandina F _{2α}
PGFM	= 13, 14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F _{2α}
PGH ₂	= prostaglandina H ₂
PGHS	= prostaglandina endoperoxidase H sintase
PGT	= proteína transportadora da prostaglandina F _{2α}
pH	= potencial hidrogeniônico
PIB	= produto interno bruto
PIP ₂	= fosfatidilinositol bifosfato
PKC	= proteína quinase C
PLA ₂	= fosfolipase A ₂
PLC	= fosfolipase C
PV	= peso vivo
RNA _m	= ácido ribonucléico mensageiro
rpm	= rotações por minuto
SC	= via subcutânea
SS	= solução salina
UI	= unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1- Lote de fêmeas Nelore com 35 a 45 dias pós parto - Fazenda Jacareúna, São Félix do Araguaia-MT, Fev/200972
- FIGURA 2- Lote de fêmeas Nelore multíparas com 40 a 70 dias pós parto - Fazenda Guanabara, Andradina-SP, Nov/2009.....73
- FIGURA 3- Lote de fêmeas Nelore primíparas com 35 a 50 dias pós parto - Fazenda Guanabara, Andradina-SP, Jan/2010.....73
- FIGURA 4- Classificação dos escores de condição corporal (ECC) em vacas Nelore, considerados no experimento: (A) ECC 2,0; (B) ECC 2,25; (C) ECC 2,50; (D) ECC 2,75.....74
- FIGURA 5- Classificação dos escores de condição corporal (ECC) em vacas Nelore, considerados no experimento: (E) ECC 3,0; (F) ECC 3,50; (G) ECC 4,0 e (H) ECC 4,50.....74
- FIGURA 6- Protocolo de indução da ovulação: (D -10) colocação de um dispositivo intravaginal contendo 1g de Progesterona (DIB® - Intervet) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol® - Intervet) via IM; (D - 2) retirada do dispositivo intravaginal + associado à injeção de 112,5µg de D-Cloprostenol (Preloban® - Intervet); 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon® - Intervet) e 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP® - Pfizer), todos via IM e (D0) após 48 horas da última injeção as vacas foram submetidas à IATF.....76

FIGURA 7 - Tratamentos utilizados: SS no D7 + SS no D16 (Grupo Controle); SS no D7 + FM no D16 (Grupo FM); bST no D7 + SS no D16 (Grupo bST); bST no D7 + FM no D16 (Grupo bST + FM); hCG no D7 + SS no D16 (Grupo hCG); hCG no D7 + FM no D16 (Grupo hCG + FM); bST e hCG no D7 + SS no D16 (bST) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (Grupo bST + hCG + FM). A SS foi aplicada no volume de 2,5mL, via IM; o hCG (Chorulon®; Intervet) foi utilizado na dose de 2.500UI, via IM; a bST (Boostin® - Intervet) foi administrado na dose de 500mg/animal, via SC e o FM (Banamine® - Intervet) foi utilizado na dose única de 2,2mg/Kg PV, via IM.....78

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1- Taxa de concepção 40 dias após a IATF, em vacas Nelore no período pós-parto, submetidas aos seguintes tratamentos: não tratadas (Controle); Flunixin Meglumine no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF.....82
- Tabela 2- Taxas de concepção (%) aos 40 dias após a IATF, em vacas Nelore no período pós-parto, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG, n= 489) no D7; tratadas ou não com Somatotropina Recombinante Bovina (bST, n= 481) no D7 e tratadas ou não com Flunixin Meglumine (FM, n= 488) no D16, sendo D0 o dia da IATF.....83
- Tabela 3- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P₄ (ng/mL) no D7, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, submetidas aos tratamentos: não tratadas (Controle); FM no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF.....84

Tabela 4- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P₄ (ng/mL) no D16, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, submetidas aos tratamentos: não tratadas (Controle); FM no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF85

Tabela 5- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P₄ (ng/mL) no D7, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, de fêmeas prenhes ou não, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) no D7; Somatotropina Recombinante Bovina (bST) no D7 e Flunixin Meglumine (FM) no D16 , considerando como D0 o dia da IATF.....86

Tabela 6- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P₄ (ng/mL) no D16, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, de fêmeas prenhes ou não, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) no D7; Somatotropina Recombinante Bovina (bST) no D7 e Flunixin Meglumine (FM) no D16 , considerando como D0 o dia da IATF.....87

EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE, DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA E/OU DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

RESUMO - Estratégias farmacológicas são empregadas para reduzir a mortalidade embrionária em fêmeas bovinas. Objetivou-se comparar o efeito do Flunixin Meglumine (FM), Somatotropina Recombinante Bovina (bST) e/ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na redução da mortalidade embrionária em vacas Nelore no período compreendido entre o 15º e 19º dias da gestação, baseando-se na taxa de concepção aos 40 dias de gestação. A hipótese é que vacas tratadas com FM, bST e/ou hCG, apresentam menor mortalidade embrionária e maiores taxas de concepção. Vacas Nelores (n=975), lactantes, com 35 a 70 dias pós-parto, receberam no D-10 um dispositivo intravaginal contendo 1g de Progesterona (DIB®) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol®), via intramuscular (IM). No D-2 o dispositivo foi removido e os animais receberam uma injeção de 112,5µg de D-Cloprostenol (Preloban®); 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon®) e 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP®), todos via IM. Após 48 horas da última injeção (D0), as fêmeas foram submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e sete dias após foram divididas equitativamente em oito grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: não tratadas (Grupo Controle; n= 124); FM no D16 (Grupo FM; n=122); bST no D7 (Grupo bST; n=119); bST no D7 + FM no D16 (Grupo bST+FM; n=121); hCG no D7 (Grupo hCG; n=124); hCG no D7 + FM no D16 (Grupo hCG+FM; n=124); bST e hCG no D7 (Grupo bST+hCG; n=120) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (Grupo bST+hCG+FM; n=121). Utilizou-se 2.500UI de hCG (Chorulon®), IM; 500mg de bST (Boostin®), via subcutânea, na fossa ísqueo-retal e 2,2mg/Kg de FM (Banamine®), IM. Amostras de sangue foram coletadas no D7 e D16, para mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona (P₄) por radioimunoensaio. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF

por ultra-som. A variável taxa de concepção foi analisada pelo modelo logístico (GLM) utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS e as concentrações de P₄ foram analisadas por ANOVA (PROC GLM). As taxas de concepção não diferiram entre os tratamentos (p=0,4995) e foram de 57,26%; 47,54%; 60,50%; 56,20%; 59,68%; 64,52%; 63,33% e 64,46% para os grupos Controle, FM, bST, bST/FM; hCG; hCG/FM; bST/hCG e bST/hCG/FM; respectivamente. Comparando-se as fêmeas tratadas ou não com hCG, verificou-se maior taxa de concepção nas tratadas (62,99% vs. 55,35%, respectivamente; p=0,01). Tal diferença não foi observada entre fêmeas tratadas ou não com bST (61,12% vs. 57,29%, respectivamente; p=0,21) e FM (58,20% vs. 60,16%, respectivamente; p=0,46). As concentrações plasmáticas de P₄ não diferiram no D7 (p=0,9081) e D16 (p=0,0888) para os diferentes grupos. As concentrações de P₄ no D7 não diferiram (p>0,05) entre vacas prenhes e não prenhes tratadas com hCG, bST ou FM. No D16, em fêmeas tratadas com hCG, as concentrações de P₄ foram maiores em fêmeas prenhes quando comparadas as não prenhes (10,62 ± 0,39 vs. 9,55 ± 0,37, respectivamente; p=0,0503). Conclui-se que vacas tratadas com 2.500UI de hCG sete dias após a IATF, apresentam menor mortalidade embrionária e maiores taxas de concepção aos 40 dias de gestação.

Palavras-chave: Antiinflamatórios, Bovinos, Concepto, Corpo Lúteo, Progesterona

EFFECT OF FLUNIXIN MEGLUMINE, RECOMBINANT SOMATOTROPIN BOVINE AND / OR HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN REDUCING MORTALITY EMBRYO IN NELORE (BOS TAURUS INDICUS)

SUMMARY - Pharmacologic strategies are employed to reduce the embryonic mortality in bovine females. The aim of the study was to compare the effect of Flunixin Meglumine (FM), Recombinant Bovine Somatotropin (bST) and/or Human Corionic Gonadotropin (hCG) on the reduction of embryonic mortality in Nelore cows in the period between the 15th and 19th days of gestation, based on conception rate at 40 days gestation. The hypothesis is that, cows treated with FM, bST and/or hCG, show lower embryo mortality and greater conception rates. Lactating Nelore cows (n=975), 35 to 70 days postpartum, received on D-10 an intravaginal device containing 1g of Progesterone (DIB®) associated with an injection of 2mg of estradiol benzoate (Gonadiol®), i.m. On D -2 the device was removed and the animals received one injection of 112,5µg of D-Cloprostenol (Preloban®); 300UI of Equine Chorionic Gonadotropin (Folligon®) and 1mg of Estradiol Cipionate (ECP®), all through i.m. route. After 48 hours from the last injection (D0), the cows were submitted to Fixed Timed Artificial Insemination (FTAI) and seven days later were divided equitably in eight groups and received one of the following treatments: untreated (Group Control; n=124); FM on D16 (Group FM; n=122); bST on D7 (Group bST; n=119); bST on D7 + FM on D16 (Group bST+FM; n=121); hCG on D7 (Group hCG; n=124); hCG on D7 + FM on D16 (Group hCG+FM; n=124); bST and hCG on D7 (Group bST+hCG; n=120) or bST and hCG on D7 + FM on D16 (Group bST+hCG+FM; n=121). Used 2.500UI of hCG (Chorulon®), IM; 500mg of bST (Boostin®), through subcutaneous route, on the ischiorectal fossa and 2,2mg/Kg of FM (Banamine®), i.m. Blood samples were collected on D7 and D16, to measure plasmatic progesterone (P₄) concentration through radioimmuneassay. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound exam 40 days after FTAI. The variable rate design was analyzed by logistic model (GLM) using the GLIMMIX procedure of SAS and the values of P₄ were transformed to

square root and analyzed by ANOVA (PROC GLM). There was no difference in conception rates for the different treatments ($p = 0.4995$), which were 57.26%, 47.54%, 60.50%, 56.20%, 59.68%, 64.52 %, 63.33% and 64.46% for groups Control, FM, bST, bST/FM, hCG, hCG/FM, bST and bST/hCG/FM, respectively. However, when the conception rate was evaluated considering all the females treated or not with hCG, a higher rate of conception on the treated animals was noted (62.99% vs. 55.35% respectively, $p = 0.01$). This difference was not observed among females treated or untreated with bST (61.12% vs. 57.29% respectively, $p = 0.21$) and FM (58.20% vs. 60, 16% respectively, $p = 0.46$). Plasma concentrations of P_4 did not differ in D7 ($p = 0.9081$) and D16 ($p = 0.0888$) for the different groups. Concentrations of P_4 in D7 did not differ ($p > 0.05$) among non-pregnant cows and heifers treated with hCG, bST or FM. The D16, in females treated with hCG, the concentrations of P_4 were greater in female pregnant compared to non-pregnant (10.62 ± 0.39 vs. 9.55 ± 0.37 , respectively; $p = 0.0503$). It was concluded that cows treated with hCG 2.500UI seven days after TAI, have lower embryo mortality and higher conception rates at 40 days of gestation.

Key words: Antiinflammatories, Bovine, Concepto, Corpus luteum, Progesterone

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Na criação de bovinos a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um adequado intervalo entre partos, ao redor de 12 meses, gerando a produção de um bezerro/matriz/ano. Em 2007, o rebanho nacional era composto por 68.809.867 matrizes, destas 55.639.882 eram vacas e 13.169.985 novilhas com mais de 24 meses. No ano seguinte, o Brasil produziu 44.110.000 bezerros (ANUALPEC, 2009). Quando se estabelece uma relação entre o número de matrizes em idade reprodutiva e o número de bezerros nascidos, estima-se uma produção nacional média de 0,64 bezerro/matriz/ano.

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. Deve-se salientar que no Brasil, nos últimos seis anos, houve uma grande agregação ao valor econômico do bezerro ao desmame, que passou de um preço médio de US\$18,8 dólares/cabeça em 2003 para US\$47,3 em 2008, aumento estimado em 251% (ANUALPEC, 2009). Desta forma, conclui-se que a baixa eficiência na produção de bezerros nascidos reduz a lucratividade e a competitividade do setor pecuário.

Considerando que a duração média do ciclo estral de uma fêmea bovina é de 21 dias, adicionado ao período de anestro pós-parto de aproximadamente 45 dias e ao da gestação de aproximadamente 290 dias, torna-se um grande desafio estabelecer um intervalo entre partos de 365 dias. A pecuária brasileira passa por um processo de transformação com o objetivo de maximizar a produtividade, pelo aumento da eficiência e utilização de tecnologias que permitam o aumento da lucratividade na produção. Dentre tais tecnologias, está a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que possibilita que as vacas sejam inseminadas e se tornem gestantes no início da estação de monta,

diminuindo o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho. Entretanto, mesmo com o emprego da IATF, a ocorrência de falhas no processo de estabelecimento da prenhez compromete o intervalo entre partos e prejudica a eficiência reprodutiva.

Em rebanhos bovinos, a mortalidade embrionária é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004a) e Sartori (2004). Nos primeiros sete dias pós-inseminação, tal mortalidade foi associada a 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).

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 compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação, posteriormente designado de “período crítico” (BINELLI et al., 2001).

Diskin e Sreenan (1980) verificaram, em novilhas de corte, que 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. Numa revisão de literatura, Kunz et al. (2002) relataram que em vacas de corte taxas de mortalidade entre 20 e 40% até 22 dias pós-inseminação. Tais informações justificam relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (ROCHE et al., 1977; SREENAN; MULVEHILL, 1975) e de 53% para vacas de raças especializadas na produção de carne (ROCHE et al., 1977).

Considerando que o rebanho nacional atualmente é composto por aproximadamente 69 milhões de fêmeas em reprodução, e que a mortalidade embrionária atinge entre 15 e 40% das fêmeas acasaladas, podem-se estimar perdas entre 10 e 28 milhões de conceitos por período reprodutivo. Reportou-se que o atraso de 21 dias na concepção de uma fêmea bovina representa um

prejuízo de US\$ 28,00 (FAVERO, 1992), portanto, a perda econômica pode ser estimada entre 308 a 840 milhões de dólares/ano.

O estabelecimento e a manutenção da gestação, bem como o crescimento embrionário em bovinos, estão relacionados à habilidade do corpo lúteo (CL) em secretar progesterona (P_4) e a capacidade do conceito em bloquear a síntese de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$).

A determinação de estratégias efetivas que possam minimizar a mortalidade embrionária entre o 15º e 19º dias de gestação torna-se imprescindível para reduzir as perdas econômicas registradas durante tal período crítico. Considerando que tais estratégias são implementadas em períodos específicos após a IATF, o emprego da IATF torna-se fundamental para possibilitar a aplicação das mesmas.

De maneira geral, tais estratégias objetivam minimizar a capacidade de síntese de $PGF2\alpha$ no endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito. Estratégias nutricionais e farmacológicas podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária. Alguns princípios farmacológicos podem ser utilizados para cumprir tais objetivos; dentre estes o Flunixin Meglumine (FM), a somatotropina recombinante bovina (bST) e a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG); que serão abordados no presente estudo.

2 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que vacas tratadas com Flunixin Meglumine (FM), Somatotropina Recombinante Bovina (bST) e/ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), apresentam menor mortalidade embrionária e, portanto maiores taxas de concepção aos 40 dias de gestação.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral comparar o uso do FM, da bST e/ou da hCG na redução da mortalidade embrionária em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), baseando-se na taxa de concepção aos 40 dias de gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Constituem os objetivos específicos do presente estudo:

A) Comparar as taxas de concepção aos 40 dias após a IATF de fêmeas tratadas com FM, bST e/ou hCG;

B) Comparar as concentrações plasmáticas de progesterona (P_4) sete e 16 dias após a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em fêmeas tratadas com FM, bST e/ou hCG;

C) Avaliar as concentrações plasmáticas de P_4 mensuradas sete e 16 dias após a IATF, em fêmeas prenhes e não prenhes, independentemente do tratamento farmacológico recebido após a IATF.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS

Falhas na detecção de estros (BARROS et al., 1998; MIZUTA, 2003; PINHEIRO et al., 1998) aliadas ao trabalhoso manejo de separação das fêmeas a serem inseminadas dentro dos grandes rebanhos (KOJIMA, 2003), constituem duas das principais limitações no emprego da inseminação artificial (IA) convencional em rebanhos de corte. De fato, em decorrência de baixas taxas de serviço, usualmente inferiores a 50%, comumente são verificados índices insatisfatórios de eficiência reprodutiva em fêmeas de corte (LUCY, 2001).

O aumento da eficiência reprodutiva decorre também de incrementos na taxa de serviço, a qual é definida como a razão entre o número de vacas inseminadas e o número total de vacas disponíveis para a reprodução. Portanto, a taxa de prenhez, definida como o produto entre a taxa de serviço e a taxa de concepção, depende da taxa de serviço. Diante deste contexto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) constitui uma biotecnologia capaz de elevar a taxa de serviço para 100%, excluindo a necessidade da detecção de estros e permitindo a inseminação de todas as fêmeas em um curto intervalo de tempo. Uma vez obtidas altas taxas de serviço, é importante assegurar uma alta taxa de natalidade. Para tanto, torna-se importante o sucesso na fertilização do oócito e no desenvolvimento do embrião e do concepto, o último caracterizado como sendo o embrião associado às membranas embrionárias anexas (MACHADO, 2005).

Em bovinos são relatadas elevadas taxas de fertilização, que alcançam valores próximos a 100% (AYALON, 1978; BREUEL et al., 1993; DISKIN; SREENAN, 1980). Além das falhas de fertilização, as perdas ocasionadas até sete dias pós-inseminação referem-se a defeitos genéticos e anormalidades no

desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Durante este período, em vacas de leite sob estresse calórico, tal mortalidade pode ultrapassar 40% (SARTORI et al., 2002; 2004). Entretanto, em vacas não especializadas na produção de leite, Diskin e Sreenan (1980) relataram que falhas de fertilização até o 8º dia pós-inseminação são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo.

Segundo o Committee on Bovine Reproduction Nomenclature (1972), a mortalidade determinada até o 24º dia de prenhez é classificada como mortalidade embrionária precoce e a ocorrida entre o 24º e o 42º dia de gestação é denominada mortalidade embrionária tardia. A morte fetal refere-se às perdas ocorridas entre o 42º dia de prenhez e o parto.

Chagas e Silva et al. (2002) verificaram a maior ocorrência de mortalidade embrionária até o 18º dia da gestação, sendo que após o 42º dia as perdas fetais foram de 5 a 8%. Da mesma forma, González (2002) concluiu que 75 a 80% das perdas embrionárias ocorrem entre o 8º e o 18º dia de gestação. Humblot (2001) reportou, em rebanhos franceses, 20,5 a 43,6% de mortalidade embrionária até o dia 25 pós-inseminação. Kunz et al. (2002) atribuíram taxas de mortalidade entre 20 e 40% até o 22º dia de prenhez. Peters (1996) observou 25% de mortalidade embrionária durante o mesmo período. Diskin e Sreenan (1980) verificaram uma mortalidade embrionária de aproximadamente 30% entre os dias 8 e 16 de prenhez.

Dunne et al. (2000) reportaram que a maioria das perdas pré-natais ao longo de toda prenhez ocorreu antes do 14º dia de gestação. De fato, Thatcher et al. (2001), verificaram que mais de 40% do total de perdas embrionárias são ocasionadas entre o oitavo e décimo sétimo dia da gestação. Parte do período relacionado às perdas embrionárias coincide cronologicamente com os eventos fisiológicos relacionados ao estabelecimento da prenhez, ou seja, com o período de inibição da liberação de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), exercida pelo conceito sobre o endométrio. O insucesso do conceito em ocasionar tal supressão determina perdas embrionárias no período compreendido entre o

15º e 19º dia pós-inseminação. Em contrapartida, qualquer fator que induza liberação de PGF2 α endometrial pode causar luteólise e a perda da gestação.

Doenças infecciosas podem causar efeitos sistêmicos que induzem liberação de prostaglandinas que, em alguns casos, podem acarretar a luteólise, conseqüentemente determinando perdas gestacionais (VANROOSE et al., 2000). Entretanto, Christianson (1992) relata que as causas não infecciosas são as mais importantes e determinam aproximadamente 70% da referida mortalidade.

Inskeep (2004) relatou que a perda da prenhez, por mortalidade embrionária e fetal, é uma das maiores causas de falhas reprodutivas nos bovinos, é a principal responsável pela redução na taxa de nascimentos, com uma incidência de aproximadamente 30% (GONZÁLEZ, 2002), podendo chegar até a 50% em rebanhos com problemas de fertilidade (GRUNERT; BERCHTOLD, 1988). Dunne et al. (2000) verificaram que a mortalidade embrionária é a maior fonte de prejuízos nas operações pecuárias e, em animais de corte, as perdas embrionárias estão diretamente relacionadas à diminuição nas taxas de desfrute da propriedade e lento progresso genético. Isso justifica relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (ROCHE et al., 1977; SREENAN; MULVEHILL, 1975), de 52% a 57% para vacas selecionadas para a produção leiteira (MAWHINNEY; ROCHE, 1978) e de 53% para vacas especializadas na produção de carne (ROCHE et al., 1977).

A estimativa de produção média do rebanho bovino brasileiro é de 0,64 bezerro/matriz/ano. Com base nos sumários estatísticos, desempenho produtivo e comercial, torna-se pertinente admitir que perdas precoces de prenhez sejam elevadas. Considerando que o rebanho nacional atualmente é composto 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. Reportou-se que o atraso de 21 dias na concepção de uma fêmea bovina representa um

prejuízo de US\$28,00 (FAVERO, 1992), portanto, a perda econômica pode ser estimada entre 308 a 840 milhões de dólares/ano.

Vacas submetidas à IATF são mais predispostas a fases luteínicas de curta duração, porque a ovulação induzida muitas vezes não permite que o útero tenha exposição adequada ao estradiol, no período pré-ovulatório. Tal condição ocasionaria aumento da responsividade endometrial ao estímulo da ocitocina (OT) e, em consequência, uma maior liberação de $\text{PGF2}\alpha$ e luteólise e, consequentemente, maior morte embrionária (MANN; LAMMING, 2000).

Diante deste contexto, torna-se evidente a relação cronológica entre a sobrevivência embrionária e os eventos fisiológicos envolvidos no estabelecimento da prenhez, como a sinalização pelo embrião de sua presença no útero e o bloqueio da luteólise. Tal período fisiológico, determinado entre o 15º e 19º dias de gestação, pode ser conceituado como o período crítico para o reconhecimento materno da prenhez. O êxito do reconhecimento materno da prenhez pelo conceito constitui um dos grandes desafios na tentativa de incremento na eficiência reprodutiva das fêmeas de corte.

4.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NO RECONHECIMENTO MATERNO DA PRENHEZ

O ciclo estral de fêmeas bovinas é mediado por um conjunto de mecanismos neuroendócrinos. A ocorrência da luteólise, entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, é de fundamental importância para determinar o fim da fase progestacional, o desenvolvimento de um folículo ovulatório, o estro e a ovulação.

Em fêmeas bovinas, é de amplo conhecimento que a $\text{PGF2}\alpha$ é o principal agente luteolítico e tem como função promover a luteólise (CARAMBULA et al., 2002; MEIDAN et al., 1999). Sabe-se ainda que a

estimulação da síntese de $\text{PGF2}\alpha$ envolve fatores endócrinos como o estradiol (E_2), a OT, a progesterona (P_4) e o hormônio luteinizante (LH).

Até o reconhecimento materno da gestação, a fisiologia uterina é semelhante entre vacas cíclicas e vacas prenhes. Há um mecanismo “pré-programado” para a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio. Sendo assim, caso o sistema biossintético da $\text{PGF2}\alpha$ não seja bloqueado, a luteólise será desencadeada independentemente da presença ou não do conceito (BINELLI et al., 2001)

Em fêmeas bovinas, um “período crítico”, evidenciado entre o 15º e 19º dias após o estro, é determinado quando o estado fisiológico reprodutivo da fêmea deve ser definido para a manutenção do CL e da prenhez ou para o desencadeamento da luteólise do estro e da ovulação. Segundo Godkin et al. (2008) durante este período, na ocorrência de uma prenhez, o conceito (embrião e membranas associadas) deve tornar-se capaz de enviar sinais anti-luteolíticos apropriados ao endométrio e este responder a tais sinais, inibindo a síntese de $\text{PGF2}\alpha$. Tal evento fisiológico nem sempre é bem sucedido, resultando na ocorrência da luteólise, na mortalidade embrionária e em perdas representativas na pecuária.

O “reconhecimento materno da gestação”, expressão que foi definida por Roger Short, em 1969, é o processo em que o conceito sinaliza sua presença para a unidade materna, tendo como consequência o bloqueio da luteólise e, portanto, a manutenção do CL funcional mantendo a gestação, devido a um diálogo bioquímico que se estabelece entre o conceito e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (SPENCER; BAZER, 2004, revisado por MARQUES et al., 2007). Especificamente, esse reconhecimento requer que moléculas do embrião interajam com o endométrio para alterar a sua “pré-programação”, bloqueando assim a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ e impedindo a luteólise (BINELLI; THATCHER, 1999).

Nos bovinos, o período crítico para a manutenção da gestação está compreendido entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, intervalo no qual a

sinalização pelo conceito deve ter ocorrido de maneira bem sucedida. Thatcher e Hansen (1992) demonstraram existir uma profunda variação de tamanhos entre conceitos ao 17º dia de gestação. Similarmente, Peterson e Lee (2003) relataram importantes diferenças no alongamento embrionário ao 14º dia de prenhez entre vacas que se mantiveram gestantes, comparadas às vacas que apresentaram mortalidade embrionária. Portanto, a simples existência do embrião no útero não assegura o bloqueio efetivo da luteólise e o reconhecimento materno da gestação. Caso tal bloqueio não seja realizado com êxito, a regressão funcional e estrutural do CL é desencadeada pela ocorrência de cinco a oito pulsos de $\text{PGF2}\alpha$ liberados pelo endométrio durante um período de 2 a 3 dias (FREDRICKSON et al., 1984; KINDHAL et al., 1976).

Em ruminantes, o interferon-tau (IFN), secretado pelo conceito, foi identificado como uma das principais moléculas envolvidas no processo anti-luteolítico. De maneira geral, o IFN inibe a regressão do CL pela supressão da liberação pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial. O IFN é capaz de promover o reconhecimento da prenhez após 14 a 16 dias da ovulação (SPENCER; BAZER, 2002; revisado por FERRAZ et al., 2008). Admite-se que o IFN produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno, cancelando a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de estradiol (ER) no endométrio (LAMMING et al., 1995; revisado por MARQUES et al., 2007). Considera-se que, por meio da inibição de ER, o IFN iniba a regulação positiva nos OTR. Com tal mudança na célula endometrial, a OT de origem hipofisária ou luteal não terá possibilidade de promover a liberação de pulsos de $\text{PGF2}\alpha$, essenciais à luteólise.

Em estudos *in vivo*, a infusão de IFN no útero prolongou o ciclo estral (MEYER et al., 1995) e diminuiu sensivelmente a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em resposta à administração de OT, comparada ao grupo controle. Além disso, infusões uterinas de IFN *in vivo* diminuíram a receptividade de explantes endometriais a estimuladores intracelulares da síntese de $\text{PGF2}\alpha$, comparando-se a explantes provenientes de vacas que receberam infusões de placebo (ARNOLD et al., 2000). Binelli et al. (2000) demonstraram *in vitro* que o

IFN diminuiu a capacidade de secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em células epiteliais do endométrio. Hernandez-Ledezma et al. (1993) demonstraram que embriões obtidos por fertilização *in vitro*, transferidos às receptoras no estágio de mórula ou blastocisto e recuperados quatro dias após, produziram maiores quantidades de IFN em cultura, quando comparados a embriões que não foram transferidos. Sugere-se, a partir de tais observações, que uma exposição ao ambiente uterino torna-se necessária para que a capacidade de produção de IFN pelo conceito seja maximizada e que provavelmente moléculas de ambos os tecidos atuem no bloqueio da luteólise.

Diante deste contexto, algumas estratégias farmacológicas podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária entre os dias 15 e 19 da gestação. Tais estratégias objetivam minimizar a capacidade de síntese de $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio materno, assim como maximizar o estímulo antiluteolítico induzido pelo conceito. Alguns princípios farmacológicos podem ser utilizados para cumprir tais objetivos. Drogas antiinflamatórias, dentre estas o Flunixin Meglumine (FM), inibem a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial. Vários fármacos incrementam a produção de P_4 durante o período crítico, dentre estes a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). A Somatotropina Recombinante Bovina (bST) constitui um princípio que favorece um maior crescimento do conceito, condição que incrementa a possibilidade de produção de IFN pelo conceito. O mecanismo de atuação dos referidos fármacos na sobrevivência embrionária será descrita a seguir.

4.3 ATUAÇÃO DAS DROGAS ANTIINFLAMATÓRIAS NA SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA

As prostaglandinas são mediadores locais produzidos por vários tecidos que desempenham um importante papel em processos biológicos e patológicos. O local responsável pela síntese de prostaglandina no útero é o

endométrio. As prostaglandinas pertencem à classe de compostos conhecidos como eicosanóides bioativos, que são derivados de ácidos graxos poliinsaturados com cadeias de 18, 20 ou 22 átomos de carbono, que desempenham funções por ações parácrinas e autócrinas em diversos órgãos e tecidos do organismo. O ácido araquidônico (AA), um ácido graxo essencial, estocado na membrana fosfolipídica, é o percussor primário das prostaglandinas associadas à reprodução, incluindo a $\text{PGF2}\alpha$ e a PGE_2 .

A síntese de $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio de fêmeas bovinas resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada. Um modelo celular da biosíntese de $\text{PGF2}\alpha$, a partir do AA, foi descrito por Burns et al. (1997). Neste modelo, em células epiteliais endometriais, a OT se liga ao seu receptor e este, associado à proteína G ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC ao ser ativado, cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de cálcio do interior do retículo endoplasmático para o citosol. O DAG ativa uma serina/treonina da proteína quinase C (PKC). Nas células endometriais, a PKC uma vez ativada, fosforila a fosfolipase A2 (PLA2). O aumento da concentração de cálcio no citosol, induzido pelo IP_3 , age estimulando a atividade da PLA2, enzima dependente de cálcio (Ca^{2+}) (CLARK et al., 1991) e, uma vez fosforilada na presença de Ca^{2+} , PLA2 torna-se ativada, transferindo-se do citosol para o retículo endoplasmático ou membrana para mobilizar AA (BURNS et al., 2000). A hidrólise do AA da membrana fosfolipídica por enzimas PLA2 é um passo limitante na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (COYNE et al., 2008). A seguir, o AA livre é convertido a prostaglandina H_2 (PGH_2) pela enzima cicloxigenase 2 (COX-2). Há duas isoformas de cicloxigenase (COX) que catalisam a conversão do AA para PGH_2 , a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (BALAGUER et al., 2005; COHN et al., 1997), enquanto a COX-2 é expressa em alguns tecidos do organismo (SIMON, 1999). A PGH_2 por ação da enzima prostaglandina

endoperoxidase H sintase (PGHS) é convertida em $\text{PGF2}\alpha$ (BALAGUER et al., 2005).

Os fatores limitantes na secreção de $\text{PGF2}\alpha$ são a disponibilidade do AA e das endoperoxido sintases, COX-1 e COX-2 (THATCHER et al., 1997). Arosh et al. (2004) analisaram a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de ambas ciclooxygenases, COX-1 e COX-2, nas células luteais grandes e pequenas, durante todo o período de duração do CL bovino. Os autores verificaram um aumento da expressão de RNAm para COX-2 entre os dias 7 e 17 do ciclo estral (D0 = estro), enquanto o RNAm para COX-1 foi expresso em baixa concentração durante toda a duração do CL. Durante o ciclo estral de bovinos, a expressão do RNAm para COX-2 no endométrio foi significativamente maior entre os dias 13 e 21 comparado ao período compreendido entre o 1º e o 12º dias do ciclo (AROSH et al., 2002). Tais autores verificaram que a maior expressão para COX-2 ocorreu no final do ciclo estral, próximo ao momento da luteólise, momento fisiológico em que a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ de origem endometrial encontra-se aumentada.

Estratégias que objetivem a inibição específica de enzimas que participem da síntese de $\text{PGF2}\alpha$, durante o período crítico, possibilitam aumentar as taxas de prenhez em fêmeas bovinas. O emprego de drogas antiinflamatórias não esteróides (AINEs), como lisinato de ibuprofeno, aspirina e FM, inibem a enzima COX-2 e, conseqüentemente, a síntese de $\text{PGF2}\alpha$.

Odensvik et al. (1998) suplementaram novilhas (n=12) com grânulos de FM, na dose de 2,2 mg/Kg de peso corporal, administrados duas, três ou quatro vezes ao dia, por um período de nove dias, começando no 14º ou 15º dia do ciclo estral. Os autores verificaram um aumento na duração do ciclo estral nas novilhas tratadas 3 (19,8 vs. 22,5 dias) e 4 (19,5 vs. 26 dias) vezes ao dia, para o grupo controle e tratado, respectivamente. Quando o antiinflamatório foi administrado 4 vezes ao dia, a ocorrência da luteólise não foi observada, até que se procedesse à suspensão do tratamento nos dias 23 e 24 do ciclo.

Elli et al. (2001) administraram 5mg/Kg PV de lisinato de ibuprofeno em receptoras de embrião (n=100), um AINEs que inibe a atividade da enzima COX-2, uma hora antes da transferência de embriões. Taxas de prenhez foram maiores para animais tratados do que para animais controle (82 vs. 56%, respectivamente). Mais recentemente, Pugh et al. (2004), trataram novilhas da raça Holandesa (n=383) com 500mg de FM ou 480mg de aspirina via oral. Os mesmos autores não verificaram diferenças nas taxas de prenhez aos 35 dias de gestação, que foi em média 64% entre os animais tratados ou não. Aos 65 dias de prenhez, os autores verificaram um aumento significativo de 18% na taxa de prenhez em vacas tratadas com aspirina, em comparação às vacas controle.

Scenna et al. (2005) estudaram o efeito de uma única dose de FM (500 mg/animal) sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vivo*. Os autores verificaram que as receptoras (n=1300) tratadas no dia da transferência dos embriões, apresentaram taxa de prenhez significativamente maior que os animais do grupo controle (n=797) (65% vs. 60%, respectivamente). No mesmo estudo, não foi verificado aumento na taxa de prenhez das receptoras que receberam embriões com qualidade de grau 1, porém, receptoras que receberam embriões grau 2 apresentaram maior taxa de prenhez quando tratadas com FM (64,2% vs. 53,5%, respectivamente). Reafirmando esses resultados, Purcell et al. (2005) também reportaram efeito benéfico do uso de FM no dia da transferência de embriões sobre a taxa de prenhez de receptoras (n=712) que receberam embriões produzidos *in vivo* frescos e congelados de grau 2 e 3 de qualidade (média e baixa qualidade, respectivamente). Apesar desses tratamentos não terem sido administrados no período crítico, é possível que a liberação de $\text{PGF2}\alpha$, resultante das manipulações associadas à transferência de embriões, estimule precocemente a luteólise. Dessa forma, a inibição de tal liberação pode explicar o aumento nas taxas de prenhez observadas.

Merrill et al. (2003) observaram uma tendência ($p = 0,17$) de vacas de corte mestiças Angus ($n=97$), tratadas com FM no dia 14 pós inseminação, apresentarem maior taxa de prenhez em relação às vacas controle. Neste mesmo estudo, os animais foram induzidos ao estresse através do transporte por um período de 4 horas, o que poderia evidenciar alguma resposta à aplicação de antiinflamatório. Os resultados encontrados por Merrill et al. (2007) corroboram os verificados no estudo anterior, com a taxa de prenhez das vacas não tratadas ($n=259$) e tratadas com FM ($n=224$). A taxa de prenhez tendeu ($p = 0,07$) a ser maior que as vacas que não receberam FM (74% vs. 66%, respectivamente), independente do transporte. No estudo, as vacas também foram submetidas de 4 a 6 horas de transporte. Verificou-se que a concentração de cortisol foi maior ($p < 0.05$) para vacas transportadas quando comparadas com as vacas não transportadas. Os autores concluíram que o transporte de vacas, aproximadamente 14 dias depois da IA, aumentou as concentrações de cortisol plasmático, mas não afetou as taxas de prenhez. Assim, o tratamento de vacas com FM aumentou a taxa de prenhez, independentemente do estresse ocasionado pelo transporte.

Guzeloglu et al. (2007) trataram novilhas de raça Holandesa ($n=52$), submetidas à IATF com duas injeções de 1,1mg/Kg PV de FM, ambas com intervalo de 12 horas, ou seja, na noite do dia 15 e na manhã do dia 16 pós IATF. Os autores verificaram nas fêmeas tratadas um aumento de 26,9% na taxa de prenhez aos 29 dias quando comparadas ao grupo controle (76,9% vs. 50%, respectivamente) e de 23% aos 65 dias de gestação (69,2% vs. 46,2%, respectivamente). Os autores concluíram que a administração de FM aumentou a sobrevivência do conceito e a taxa de prenhez. Tal efeito provavelmente decorreu do retardamento na síntese de $\text{PGF2}\alpha$, condição que ofereceu ao conceito um tempo maior para desenvolver sua capacidade de inibir a síntese de $\text{PGF2}\alpha$.

Pfeifer et al. (2008) testaram a aplicação do FM no 14º dia após IATF em 115 vacas com aproximadamente 100 dias pós-parto e 43 novilhas de corte mestiças (*Bos taurus* × *Bos indicus*). O FM não incrementou as taxas de

prenhez em vacas (42,4% vs. 42,8%; tratadas e controle respectivamente) e novilhas (39,1% vs. 25,0%; tratadas e controle respectivamente).

Geary et al.(2009) realizaram três experimentos utilizando novilhas e vacas com os estros sincronizados. No experimento 1, novilhas (n = 1.221) de cinco propriedades diferentes receberam FM ou nenhum tratamento (controle). As novilhas receberam o FM em média aos 13 dias pós inseminação, variando de 10 a 15 dias depois. As novilhas controle não foram manejadas para o curral e não receberam injeção placebo. As taxas de prenhez da IA foram menores ($P = 0,02$) para as novilhas tratadas com FM (66%) em relação às novilhas controle (72%). No experimento 2, vacas de corte amamentando (n = 719) sincronizadas de dois locais, foram divididas para receber FM ou sem tratamento (controle). Entre 11 e 13,5 dias após a IA, somente as vacas FM foram manejadas para receber o tratamento. As taxas de prenhez da IA não diferiram ($P = 0,80$) entre as vacas FM (57%) e controle (59%). No experimento 3, novilhas (n = 247) e vacas de corte amamentando (n = 335) sincronizadas de uma propriedade foram separadas para receberem FM ou nenhuma injeção (controle), aproximadamente 13 dias após a IA. Entretanto, no experimento 3, todas as fêmeas foram manejadas para serem tratadas ou não. As taxas de gestação a IA, não foram diferentes ($P = 0,37$) entre as vacas tratadas com FM (45%) e controle (42%) ou nas novilhas tratadas FM (56%) e controle (55%). Os autores concluíram que a administração de FM na dose de 1,1 mg / kg de peso corporal, aproximadamente 13 dias após a IA não melhorou a taxa de prenhez das vacas e novilhas e que os efeitos do manejo para a realização das injeções de FM reduziria o sucesso no estabelecimento da gestação.

4.4 ATUAÇÃO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA NA SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA

A somatotropina ou hormônio do crescimento da hipófise anterior foi inicialmente reconhecido pela sua capacidade em promover alterações no metabolismo de carboidratos, crescimento do esqueleto e aumento do peso corporal em animais jovens. Tal hormônio foi caracterizado como um polipeptídeo com 191 aminoácidos, com peso molecular de 21 kDa e foi artificialmente obtido pela abordagem do DNA recombinante originando a somatotropina recombinante bovina (bST) (LEHNINGER, 1991). A bST foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em grande escala para a indústria animal (BAUMAN, 1992), visando aumentar a produção de leite.

A bST promove o crescimento (GLUCKMAN et al., 1987) pela regulação de processos fisiológicos e metabólicos dos animais. A bST determina a síntese do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) e de proteínas transportadoras de tais fatores (IGFPB) que atuam como mediadoras nos processos metabólicos (LUCY, 1996). A bST também apresenta propriedades anabolizantes (LUCY, 2000). De fato, aumentos do GH e do IGF-1 têm sido relatados, após administração de bST. A partir destas observações, sugere-se a participação de tais moléculas no mecanismo pelo qual a bST estimula o desenvolvimento folicular (BEVERS et al., 1997; GONG et al., 1997; KIRBY et al., 1997) e acelera o desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002b). Deve-se ressaltar que o IGF-1 é um potente agente mitogênico em resposta ao estímulo de GH (COHICK, 1998) e que a maior parte do IGF-1 circulante tem origem a partir da síntese hepática (LUCY, 2000).

Flores et al. (2007) verificaram em vacas da raça Brahma (n=99), multíparas, no pós-parto, com baixo escore de condição corporal (ECC), que a bST reduziu a intensidade de comportamento estral no pós-parto quando a bST foi administrada 35, 21 e 7 dias antes do início da estação de monta. Porém, as fêmeas tratadas com bST apresentaram maior taxa de concepção no primeiro-

serviço. Os mesmos autores sugeriram que a bST alteraria outros hormônios metabólicos que poderiam influenciar os folículos ovarianos, em vacas no período pós-parto.

Flores et al. (2008) relacionaram o ECC de vacas de corte (n=99) com a resposta ao tratamento com bST. Referidos autores verificaram que a restrição nutricional comprometeu a relação positiva do eixo de GH-IGF, aumentou o GH e reduziu o IGF-1. Em fêmeas de corte com baixo ECC, a dinâmica folicular foi influenciada por GH e IGF-1, pois tais fêmeas tiveram menor desenvolvimento folicular quando comparadas com vacas de ECC adequado. Nesse estudo, as vacas com baixo ECC tratadas com bST (n=25) tiveram um aumento de IGF-1 quando comparadas com as vacas do grupo controle, que não receberam bST (n=25), nos dias 32, 46 e 60 do pós-parto.

Mann e Lamming (2001) relataram uma notável correlação entre o tamanho do conceito no período crítico do reconhecimento materno e a quantidade de IFN encontrada no lúmen uterino. Inferiram também que conceitos com menor desenvolvimento estão diretamente associados a baixas quantidades de IFN intra-uterino e, conseqüentemente, associados às falhas no bloqueio da liberação de prostaglandina pelo endométrio, resultando em altos índices de perda embrionária.

Durante o período crítico, o conceito bovino apresenta uma fase de crescimento rápido em seu tamanho. Thatcher e Hansen (1992) encontraram conceitos variando entre 15 a 250 mm, no 17º dia de gestação, em vacas de leite. Conceitos menores não são capazes de sintetizar IFN suficiente para bloquear a luteólise. Logo, a gestação comumente é interrompida, uma vez que o conceito torna-se incapaz de enviar sinais anti-luteolíticos para o endométrio materno. Portanto, segundo os trabalhos supracitados, uma boa taxa de desenvolvimento embrionário inicial é extremamente importante para a obtenção de um conceito com grande alongamento no período crítico do reconhecimento materno. O conceito que apresenta maior alongamento durante esse período, conseqüentemente apresenta maior área de contato com o lúmen uterino e também maior capacidade de secretar grandes quantidades

de IFN, tendo assim, maior capacidade de bloquear a liberação do $\text{PGF2}\alpha$ endometrial e impedir a luteólise. Estratégias visando estimular o crescimento do conceito devem contribuir para o bloqueio da luteólise. Nesse contexto, a administração de bST constitui uma estratégia que maximiza a capacidade do conceito em bloquear a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial, por estimular o crescimento do conceito (MOREIRA et al., 2002a; 2002b).

O tratamento com bST tem aumentado a fertilidade de vacas de leite de alta produção submetidas a IATF (MOREIRA et al., 2000; 2001; SANTOS et al., 2004), em vacas consideradas subférteis (MORALES-ROURA et al., 2001), e em doadoras e receptoras de embriões (MOREIRA et al., 2002a). Estes resultados são atribuídos principalmente aos efeitos positivos do GH e do IGF-1 na fertilização e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002a; 2002b).

De fato, Moreira et al. (2002b) verificaram que a administração de bST melhorou as taxas de fertilização, acelerou o desenvolvimento embrionário e melhorou a qualidade dos embriões. Em outro estudo, Moreira et al. (2002a) administraram 500mg de bST em doadoras de embriões e/ou receptoras, em um delineamento fatorial 2×2 . No experimento, as doadoras foram tratadas com bST no dia da IA e as receptoras no dia em que receberam o embrião. A administração de bST aumentou a porcentagem de embriões transferíveis, o número de blastocistos obtidos por lavagem e as taxas de prenhez. As taxas de prenhez foram de 25,6% para doadora controle/receptora controle (n=43), 43,2% para doadora controle/receptora tratada (n=37), 56,1% para doadora tratada/receptora controle (n=41) e 43,3% para doadora tratada/receptora tratada (n=60). Assim, não houve um efeito aditivo quando receptoras tratadas com bST receberam embriões provenientes das doadoras tratadas. Nesse contexto, a bST favorece o crescimento do embrião e membranas anexas, assim como o epitélio uterino favorecendo um micro ambiente mais favorável ao conceito. Concluiu-se que tanto os componentes maternos quanto embrionários são positivamente afetados pelo emprego da bST. De fato,

Santos et al. (2004) aumentaram as taxas de concepção quando vacas em lactação (n=840) foram tratadas com bST.

Carrillo et al. (2007) trataram ovelhas Pelibuey 5 dias antes do fim da sincronização do estro com 125mg de rbST (n = 47) ou com solução salina (n = 45). Após a remoção da esponja vaginal, as ovelhas tiveram os estros observados e subsequentemente foram acasaladas duas vezes. O tratamento com bST aumentou ($p < 0,01$) a proporção de ovelhas que pariram mais de um cordeiro (56% vs. 26%; para tratadas e controle, respectivamente) e a prolificidade (1,6 vs. 1,3; para tratadas e controle, respectivamente). O tratamento com bST aumentou a taxa de parição em ovelhas múltiparas (92% vs. 67%; para tratadas e controle, respectivamente) mas não em ovelhas primíparas (71% vs. 87%; para tratadas e controle, respectivamente). As concentrações de IGF-1 foram mais altas nas ovelhas tratadas com bST do que em ovelhas do grupo controle, 48 horas depois do tratamento. As concentrações de P_4 não variaram entre os grupos. Os autores concluíram que uma única dose de bST, administrada 5 dias antes da retirada da esponja de P_4 , aumentou a taxa de parição e a prolificidade das ovelhas. Estes efeitos foram associados com o aumento na concentração circulante de IGF-1 nas ovelhas.

Jousan et al. (2007) verificaram em fêmeas bovinas, que a bST aumenta a secreção de IGF-1. Os mesmos autores sugerem que tal efeito promoveria a sobrevivência do embrião e a proteção dos embriões em desenvolvimento contra os efeitos da apoptose e do estresse térmico. Vacas da raça Holandesa (n=276), lactando, submetidas ao estresse térmico, foram tratadas com bST, sete dias antes do início da sincronização dos estros pelo protocolo "Ovsynch". O tratamento foi repetido após duas semanas. Observou-se que o tratamento com bST, durante o estresse térmico, aumentou as concentrações de IGF-1, a produção de leite, a temperatura retal e vaginal. Entretanto não alterou a taxa de prenhez das vacas submetidas ao estresse térmico. De fato, Blevins et al. (2006) não verificaram incremento nas taxas de prenhez de vacas de leite (n=144) tratadas com bST. Os mesmos autores sugeriram que os resultados

controversos na taxa de prenhez de vacas tratadas com bST, possivelmente decorram das diferentes doses de bST administradas. Bell et al. (2008) utilizaram apenas uma dose de bST no período pré-ovulatório, administrada no dia da IA ou três dias antes da IATF, em vacas de leite em início de lactação (n=100), submetidas ou não ao estresse térmico. O tratamento não apresentou efeito benéfico na fertilidade das vacas tratadas.

Bilby et al. (2004) relataram redução nas taxas de prenhez em vacas de leite não lactantes quando a bST foi administrada imediatamente após a IA e novamente 11 dias depois. Quando administrado 11 dias após, verificou-se um efeito negativo nas taxas de prenhez, possivelmente em razão de uma hiper estimulação na concentração de IGF-1. A taxa de prenhez foi mais alta no grupo controle, onde concentrações basais séricas de IGF-1 se aproximaram das observadas em vacas lactantes. Em contraste, vacas em lactação com baixa fertilidade apresentam baixas concentrações séricas de IGF-1. Em alguns estudos, verificou-se que em novilhas de leite não lactantes (RORIE et al., 2004) e vacas de corte em lactação (BILBY et al., 1999) as concentrações séricas de IGF-1 são mais altas quando comparadas a vacas de leite em lactação (BILBY et al., 1999). Nesses estudos supracitados, a administração de bST não resultou em um efeito benéfico, ou até mesmo causou efeitos negativos sobre a taxa de prenhez.

Bilby et al. (2006) testaram em vacas de leite de alta produção no início da lactação (n=16), bST no D0 e D11 da IATF, considerando o D0 como o dia da IATF. A bST aumentou a produção de leite, a taxa de prenhez [83% (5/6) vs. 40% (4/10); tratadas e não tratadas, respectivamente], o tamanho do concepto (45 vs. 34 cm; tratadas e não tratadas, respectivamente) e a concentração de IFN no lavado de lúmen uterino (9,4 vs. 5,3 µg; tratadas e não tratadas, respectivamente). O tratamento com bST aumentou a concentração plasmática de GH e IGF-1. Nas vacas cíclicas e prenhes, a bST diminuiu a concentração sérica de P₄. Em síntese, a bST parece modular respostas reprodutivas que podem ser benéficas ao concepto em desenvolvimento e à taxa de prenhez.

4.5 ATUAÇÃO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) possui atividade semelhante à do LH e a sua administração, em diferentes fases do ciclo estral bovino, promove a ovulação do folículo dominante, a formação de um CL acessório e o aumento da concentração plasmática da P_4 (MACHADO, 2005). A aplicação de hCG, entre quatro e sete dias após o estro, promove a ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento, induzindo a formação de um CL acessório e também atua diretamente sobre o CL original, aumentando o tamanho das células luteínicas. Desta forma, a hCG promove o aumento nas dimensões do CL e na produção de P_4 . A ação luteotrófica da hCG decorre da combinação de seus efeitos sobre o CL original (preexistente em D5) e da formação do CL acessório (MACHADO et al., 2006).

Diversos estudos relataram que altas concentrações séricas de P_4 favorecem o meio ambiente uterino, gerando condições mais favoráveis para o desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas bovinas (DISKIN et al., 2006; LAMMING et al., 1989; MANN et al., 1999; STRONGE et al., 2005). Mann et al. (1996) e Mann et al. (1998) recuperaram embriões 16 dias após a inseminação e os classificaram como embriões bem ou mal desenvolvidos. A análise das concentrações plasmáticas de P_4 demonstrou que vacas com baixas concentrações durante a fase luteínica estavam relacionadas com a presença de embriões mal desenvolvidos. Starbuck et al. (2001) avaliaram as concentrações de P_4 no leite em 1400 vacas holandesas no 5º dia pós-ovulação e constataram alta correlação entre vacas que apresentaram baixas concentrações de P_4 no D5 com menores índices de prenhez. No estudo, vacas com adequadas concentrações de P_4 no leite (> 3 ng/ml) tiveram taxas de prenhez em torno de 50-55% enquanto vacas com baixas concentrações de P_4 no leite (< 1 ng/ml) apresentaram taxas de prenhez inferiores a 10%.

No entanto, Chagas e Silva et al. (2005) não encontraram efeito significativo na taxa de prenhez em novilhas leiteiras (n=325) tratadas com 1500 UI de hCG no D7. A concentração plasmática de P_4 foi relacionada significativamente à sobrevivência de embrião somente no D17, considerando o D0 como o dia do estro.

Wathes et al. (2003) sugeriram que um atraso na elevação inicial das concentrações de P_4 medidas no leite estaria relacionado com baixas taxas de prenhez. A partir de tais relatos, sugere-se que fêmeas contendo CL com capacidade de elevar rapidamente as concentrações de P_4 , assim como mantê-las, favorece um maior desenvolvimento do conceito. Tais conceitos seriam mais competentes em bloquear a luteólise. De fato, Geisert et al. (1988) observaram em fêmeas tratadas com P_4 endógena um aumento na taxa de crescimento embrionário e, conseqüentemente, na capacidade de produzir IFN.

Carter et al. (2008) observaram que maiores concentrações séricas de P_4 no período pós-concepção imediato estão associadas com um aumento na taxa de crescimento embrionário, produção de IFN e taxa de prenhez em vacas. Com base nessa afirmação, os mesmos autores delinearam um experimento para verificar o efeito da concentração de P_4 crescente no D3 na sobrevivência e desenvolvimento do embrião. Foram sincronizadas 263 novilhas de corte meio sangue e usadas apenas 210 novilhas que apresentaram sinais de estro. Para garantir o número necessário de novilhas prenhes, aproximadamente 33% das novilhas foram inseminadas, enquanto o remanescente não foi inseminado. Para produzir animais com concentrações divergentes de P_4 , a metade dos animais recebeu um CIDR no D3, que permaneceu até o dia do abate. Os quatro grupos de tratamento foram: P_4 alta e prenhe; P_4 normal e prenhe; P_4 alta e não prenhe e P_4 normal e não prenhe. As amostras de sangue coletadas nos dias 5, 7, 13 ou 16, referiram-se ao embrião e conceito em diferentes estágios de desenvolvimento, respectivamente de embrião em estágio de 16 células (D5), blastocisto organizado (D7), conceito no início da fase de alongamento (D13) e conceito no período de reconhecimento materno da prenhez (D16). Os embriões foram

recuperados por lavagem uterina e classificados por fase de desenvolvimento e, no caso dos dias 13 e 16, foram medidos quanto ao tamanho. A inserção do CIDR no D3 aumentou ($p < 0,05$) as concentrações de P_4 do D3,5 em diante. Não houve nenhuma diferença entre os tratamentos na proporção de embriões na fase esperada de desenvolvimento nos dias 5 ou 7 ($p > 0,05$). A proporção de embriões viáveis recuperados foi numericamente maior no grupo de P_4 alta no D13 (58% vs. 43%) e D16 (90% vs. 50%). A elevação da P_4 aumentou significativamente o comprimento embrionário no D13 ($2,24 \pm 0,51\text{mm}$ vs. $1,15 \pm 0,16\text{mm}$; $p = 0,034$) e no D16 ($14,06 \pm 1,18\text{cm}$ vs. $5,97 \pm 1,18\text{cm}$, $p = 0,012$). Os autores observaram que a inserção do CIDR no D3 do ciclo estral aumentou as concentrações de P_4 plasmática nos dias subsequentes, não apresentou nenhum efeito no desenvolvimento embrionário nos dias 5 ou 7, mas foi associado com um aumento no tamanho embrionário nos dias 13 e 16.

Neste contexto, o aumento das concentrações plasmáticas de P_4 , antes e durante o período crítico, possivelmente resulta em maiores taxas de prenhez. Algumas estratégias farmacológicas podem ser empregadas com tal objetivo, para proporcionar condição fisiológica que favoreça a sobrevivência embrionária durante o período crítico. Para tal finalidade comumente administra-se o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), Hormônio Luteinizante (LH) ou o hCG. Tais fármacos, mediante a estimulação dos receptores de LH, promovem a ovulação do folículo dominante e a formação de um CL acessório, além de estimularem diretamente uma maior produção de P_4 no CL já existente. Tais efeitos objetivam favorecer a produção de P_4 , condição que propicia um micro ambiente uterino mais favorável para o desenvolvimento do conceito.

Após diversos experimentos realizados para identificar os fatores que interferem na concentração plasmática de P_4 , Mann et al. (2001) concluíram que tal acontecimento é um fenômeno multifatorial. Porém os mesmos autores observaram em vacas de leite uma correlação entre baixas concentrações de P_4 no 5º dia de gestação e ECC reduzido além de baixas concentrações plasmáticas de leptina. Os autores concluíram que o baixo status energético

pode ser considerado uma causa parcial da baixa secreção de P_4 no período pós-ovulatório.

Diversos autores estimularam farmacologicamente a ovulação do folículo dominante da primeira onda de desenvolvimento folicular, visando a formação de um CL acessório. Santos et al. (2001) trataram vacas Holandesas em lactação com 3300 UI de hCG 5 dias pós-inseminação e obtiveram aumento no número de CL e na concentração plasmática de P_4 em relação ao grupo não tratado com hCG. Os autores também observaram maiores taxas de concepção para os animais tratados. Kastelic e Ambrose (2004) trataram vacas com 12,5mg LH ou 2500UI de hCG no D5 após IA e verificaram um aumento nas concentrações de P_4 , entretanto, houve apenas aumento numérico nas taxas de prenhez em relação ao grupo controle. Observações similares foram obtidas por Machado et al. (2004), que administraram 3000UI de hCG no D5 em vacas Nelore. Marques et al. (2002) comparou as concentrações séricas de P_4 em novilhas receptoras de embrião tratadas com GnRH, LH ou hCG e verificou que, apesar das injeções terem estimulado a produção de um CL acessório, apenas o tratamento com hCG aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de P_4 e as taxas de prenhez. Goissis et al. (2004) verificou em vacas Holandesas não lactantes que a administração de 20mg LH, no D6, não estimulou o aumento da produção de P_4 , apesar da formação de um CL acessório. Sugere-se, a partir destas observações, que a formação de um CL acessório não garante o aumento nas concentrações de P_4 , contudo, um aumento consistente nas concentrações séricas de P_4 ocorre em animais tratados com hCG. Tal ação provavelmente decorre da maior meia-vida sanguínea do hCG comparado ao GnRH e LH, característica que garante ao hCG um efeito estimulatório mais duradouro na esteroidogênese luteínica.

Stevenson et al. (2007) também administraram em vacas Holandesas de cinco diferentes rebanhos, 4 a 9 dias depois da IA, 3.300 UI de hCG ($n = 714$), 100g de GnRH ($n = 719$), inseriram CIDR ($n = 711$) ou não trataram as fêmeas ($n = 708$). A taxa de ovulação foi de 78% em resposta à hCG e de 60% em resposta ao GnRH, enquanto no grupo controle tal taxa foi de 2,4%. As vacas

tratadas com GnRH ou hCG apresentaram maior número de CL, entretanto, apenas nas vacas tratadas com hCG verificou-se aumento nas concentrações plasmáticas de P_4 . Os diâmetros dos folículos dominantes no D7 foram menores para as vacas tratadas com GnRH e hCG. O volume do CL original foi aumentado pelo hCG mas tendeu a ser reduzido nas vacas tratadas com CIDR e GnRH. O tratamento com hCG aumentou a taxa de concepção em vacas de segunda lactação. O CIDR tendeu a aumentar e a hCG aumentou a taxa de concepção em dois rebanhos, considerando que o CIDR diminuiu a taxa de concepção em um dos rebanhos. A manutenção da prenhez foi reduzida pelo GnRH em comparação com o grupo controle. Os autores concluíram que o GnRH e a hCG induziram a ovulação e aumentaram o número de CLs. Entretanto, o aumento da concentração plasmática de P_4 ocorreu apenas em vacas hCG-tratadas. O tratamento com o CIDR ou hCG aumentou as taxas de concepção em alguns dos rebanhos.

Stevenson et al. (2008) trataram 421 vacas de leite com 100g de GnRH, 1000 UI de hCG ou 2mL de solução salina entre 26 e 71 dias de prenhez. Foram formados novos CL nas vacas tratadas com hCG (50%) e GnRH (26%) quando comparado ao grupo controle (7%). As perdas de prenhez foram inalteradas pelo tratamento. As concentrações de P_4 plasmáticas não diferiram entre tratamentos, mas entre fêmeas que formaram uma nova estrutura lútea, a P_4 estava maior na 1ª ($7,2 \pm 0,3$ vs. $6,3 \pm 0,2$ ng/mL) e 2ª semana ($7,0 \pm 0,3$ vs. $6,1 \pm 0,2$ ng/mL) depois do tratamento. O ovário direito foi predominante na localização de novas estruturas lúteas. O tratamento de vacas de leite com GnRH ou hCG não preveniu perda de prenhez, mas as concentrações de P_4 permitiram prever a perda da prenhez subsequente.

Funston et al. (2005) utilizaram hCG em 593 novilhas de corte em duas fazendas, 5 dias depois da IA e verificaram que a concentração plasmática de P_4 foi maior no grupo tratado (8,6 vs. 4,6ng/mL na fazenda 1 e 11,2 vs. 5,6ng/mL na fazenda 2). As taxas de concepção não tiveram diferença estatística. Um segundo estudo foi realizado com 180 novilhas em uma terceira fazenda para determinar os efeitos da administração de hCG 6 dias depois da

IATF. A taxa de prenhez para IATF não diferiu entre as fêmeas tratadas com hCG (62%) e novilhas controle (59%) aos 50 dias. Os autores concluíram que a administração de hCG 5 a 6 dias depois da IATF não melhorou a taxa de concepção ou de prenhez em duas das três fazendas avaliadas e sugerem que P_4 insuficiente não é um fator principal que contribui para o fracasso da prenhez em novilhas de corte.

REFERÊNCIAS

ANUALPEC 2009. anuário da pecuária brasileira / Instituto FNP - São Paulo: FNP, 2009. 360 p.

AROSH, J.A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A.; Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 161-169, 2002.

AROSH, J.A.; BANU, S.K.; CHAPDELAINE, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v. 145, p. 2551-2560, 2004.

ARNOLD, D.R.; BINELLI, M.; VONK, J.; ALEXENKO, A.P.; DROST, M.; WILCOX, C.J.; THATCHER, W.W. Intracellular regulation of endometrial PGF_{2α} and PGE₂ production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon-τ. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 18, p.199-216, 2000.

AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 483-493, 1978.

BALAGUER, S.A.; PERSHING, R.A.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L. Effects of bovine somatotropin on uterine genes related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 543-552, 2005.

BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of estrous cycle to improve artificial insemination or embryo transfer

programs. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, p. 179-198. 1998. Suplemento 26.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal thechnology. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3432-3451,1992.

BELL, A.; RODRÍGUEZ, O.A.; CASTRO E PAULA, L.A.; PADUA, M.B.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; GUTIÉRREZ, C.G.; DE VRIES, A.; HANSEN, P.J. Pregnancy success of lactating Holstein cows after a single administration of a sustained-release formulation of recombinant bovine somatotropin. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 22, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/22>>. Acesso em: 24 jul. 2009.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HURK, V.D.R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BILBY, T.R.; GUZELOGLU, A.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, S.M.; MICHEL, F.; HEAD, H.H.; THATCHER, W.W. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3256–3267, 2004.

BILBY, T.R.; SOZZI, A.; LOPEZ, M.M.; SILVESTRE, F.T.; EALY, A.D.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus and growth hormone–insulin-like growth factor system response. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3360–3374, 2006.

BILBY, C.R.; BADER, J.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; MURPHY, C.N.; GARVERICK, H. A.; CROOKER, B.A.; LUCY, M.C. Plasma GH, IGF-1, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology** , v. 51, p. 1285–1296, 1999.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 1, p. 59-85, 1999.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.52, p. 1451-1463, 2001.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, J.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Interferon- τ modulates phorbol Ester-induced production of protdagladin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 417-424, 2000.

BLEVINS, C.A.; SHIRLEY, J.E.; STEVENSON, J.S. Milking frequency, estradiol cypionate, and somatotropin influence lactation and reproduction in dairy cows. **Journal o f Dairy Science**, v. 89, p. 4176-4187, 2006.

BREUEL, K.F.; LEWIS, P.E.; INSKEEP, E.K.; BUTCHER, R.L. Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 205-212, 1993.

BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2 α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 181-191, 1997.

BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Effect of oxytocin on expression of cytosolic phospholipase A₂ mRNA and protein in ovine endometrial tissue *in vivo*. **Domestical Animal Endocrionology**, v. 19, p. 237-246, 2000.

CARAMBULA, S.F.; MATIKAINEN, T.; LYNCH, M.P.; FLAVELL, R.A.; GONÇALVES, P.B.; TILLY, J.L.; RUEDA, B.R.; Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, p. 1495-1501, 2002.

CARRILLO, F.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; OROZCO, V.; HERNÁNDEZ, J.A.; GUTIÉRREZ, C.G. A single dose of bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization increases prolificacy in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 31–37, 2007.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.O.; KENNY, D.A.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 368–375, 2008.

CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. **Theriogenology**, v. 64, p. 49-60, 2005.

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.

CHRISTIANSON, W.T. Stillbirths, mummies, abortion and early embryonic death. **The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 8, p. 623-639, 1992.

CLARK, J.D.; LIN, L.L.; KRIZ, R.W.; RAMESH, C.S.; SULTZMAN, L.A.; LIN, A.Y.; MILONA, N.; KNOFF, J.L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, p. 1043-1051, 1991.

COHICK, W.S. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 1769-1777, 1998.

COHN, S.M.; SCHOLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBERT, K.; STENSON, W.F. Crept stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **Journal of Clinic Investigation**, v. 99, p. 1367-1379, 1997.

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

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; CHILDS, S.; SCREENAN, J.M.; WATERS, S.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 70, p. 772-782, 2008.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal Reproduction and Fertility**, v.59, p.463-68, 1980.

DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.297-311, 2006.

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

ELLI, M.; GAFFURI, B.; FRIGERIO, A.; ZANARDELLI, M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 151-154, 2001.

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

FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T. Diálogo materno-fetal, reconhecimento materno da gestação e principais aspectos sobre perdas embrionárias em bovinos **PUBVET**, v. 2, Fev 1, 2008.

FLORES, R.; LOOPER, M.L.; RORIE, R.W.; HALLFORD, D.M.; ROSENKRANS JUNIOR, C.F. Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v.86, p. 1335–1344, 2008.

FLORES, R.; LOOPER, M.L.; RORIE, R.W.; LAMB, M.A.; REITER, S.T.; HALLFORD, D.M.; KREIDER, D.L.; ROSENKRANS JUNIOR, C.F. Influence of body condition and bovine somatotropin on estrous behavior, reproductive performance, and concentrations of serum somatotropin and plasma fatty acids in postpartum Brahman-influenced cows. **Journal of Animal Science**, v.85, p. 1318–1329, 2007.

FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H.; EDQVIST, L.E. 11-Ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator for measuring prostaglandin release during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the goat. **Animal Reproduction Science**. v.7, p.537-545, 1984.

FUNSTON, R.N.; LIPSEY, R.J.; GEARY, T.W.; ROBERTS, A.J. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1403-1405, 2005.

GEARY, T.W.; ANSOTEGUI, R.P.; MACNEIL, M.D.; ROBERTS A.J.; WATERMAN R.C. Effects of flunixin meglumine on pregnancy establishment in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 943-949, 2009.

GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; BIGGERS, B.G.; GARRET, J.E.; WETTEMANN, R.P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v.16, p.11-25, 1988.

GLUCKMAN, P.D.; BREIER, B.H.; DAVIS, S.R. Physiology of the somatotropin axis with particular reference to the ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 442-466, 1987.

GODKIN, J.D.; ROBERTS, M.P.; ELGAYYAR, M.; GUAN, W.; TITHOF, P.K. Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 44, 2008.

GOISSIS, M.D.; BRESSAN, F.F.; ALMEIDA, A.B.; BERTAN, C.M.; BINELLI, M. Influence of an accessory corpus luteum (CL) on estradiol 17- β (E2)-induced prostaglandin F2 α (PGF2 α) release in cattle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p.125 (resumo).

GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.91-97, 1997.

GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária. [on line]. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolveter.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2009.

GRUNERT, E.; BERCHTOLD, M. **Infertilidad en la vaca**. Montevideo: Hemisfério Sur, 1988. 475p.

GUZELOGLU, A.; ERDEM, H.; SARIBAY, M.K.; THATCHER, W.W.; TEKELI, T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. **Veterinary Record**, v. 160, p. 404-406, 2007.

HERNANDEZ-LEDEZMA, J.; MATHIALAGAN, N.; VILLANUEVA, C.; SIKES, J.D.; ROBERTS, R.M. Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived blastocyst is correlated with their morphological quality and stage of development. **Molecular Reproduction Development**, v. 36, p. 1-6, 1993.

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

INSKEEP, E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 24-39, 2004.

JOUSAN, F.D.; CASTRO E PAULA, L.A.; BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Fertility of Lactating Dairy Cows Administered Recombinant Bovine Somatotropin During Heat Stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.341–351, 2007.

KASTELIC, J.P.; AMBROSE, J.D. Effects of modified OvSynch protocols, including presynchronization, and/or post-breeding pLH or hCG, on pregnancy rates in dairy cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 334, (resumo).

KINDAHL, H.; EDQUIST, L.E.; BANE, A.; GRANSTRÖM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2alpha during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. **Acta Endocrinologica**, v. 82, p. 134-149, 1976.

KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.273-285, 1997.

KOJIMA, F.N. The estrous cycle in cattle, physiology, endocrinology and follicular waves. **The Professional Animal Scientist**, v. 19, p. 83-95, 2003.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA-FILHO, B.D.; GALINDO, A.D.S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista CFMV**, v.8, p.27-36, 2002.

LAMMING, G.E.; DARWASH, A.O.; BLACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 245-252, 1989.

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

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LUCY, M.C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1635-1647, 2000.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1277-1293, 2001.

LUCY, M.C. Use of bovine somatotropin to increase follicular growth in cattle: Applications to superovulation. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION. 15., Portland, 1996. **Proceedings...** Portland p. 61-70, 1996.

MACHADO, R. **A remoção farmacológica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos.** 2005. 198f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BARBOSA, R.T.; MADUREIRA, E.H.; FANTINI, D.; BINELLI, M. Strategies to prevent the presence of a dominant follicle (DF) between days 15 and 20 of the cow estrous cycle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 118.

MACHADO, R.; BARBOSA, R.T.; BARBOSA DA SILVA, J.C.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BERTAN, C.M.; SARTI, L.L.; BINELLI, M. **A redução da mortalidade embrionária -estratégia hormonal para otimizar a função luteínica em bovinos.** São Carlos – SP: EMBRAPA, 2006. (Circular Técnica)

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanisms in the cow. **Reproduction**, v.121, p. 175-180, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory estradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 171-180, 2000.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; FISHER, P.A. Progesterone control of interferon- τ production during early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series**, n. 21, 1998. (Abstract 37).

MANN, G.E.; MANN, S.J.; LAMMING, G.E. The inter-relationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series**, n.17, 1996 (Abstract 55).

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

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

MARQUES, V.B.; BERTAN, C.M.; ALMEIDA, A.B.; MEIRELLES, F.V.; PAPA, P.C.; BINELLI, M. Interferon-tau e o reconhecimento materno da gestação em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 479-488, 2007.

MAWHINNEY, S.; ROCHE, J.F. Factors involved in oestrus cycle control in the bovine. In: SREENAN, J.M. (Ed.). **Control or reproduction in the cow**. Luxembourg: EEC, 1978. p. 511-530.

MEIDAN, R.; MILVAE, R.A.; WEISS, S.; LEVY, N.; FRIEDMAN, A. Intraovarian regulation of luteolysis. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v. 54, p. 217-228, 1999.

MERRILL, M. L.; ANSOTEGUI, R.P.; BURNS, P. D.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1547-1554, 2007.

MERRILL, M.L.; ANSOTEGUI, R.P.; WAMSLEY, N.E.; BURNS, P.D.; GEARY, T.W. Effects of flunixin meglumine on embryonic loss in stressed beef cows. In: ASAS Western Section Meeting, 54, 2003. **Proceedings...** Denver: ASAS, 2003. p. 53-55.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, J.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ of cows in response to recombinant interferon-tau. **Journal of Dairy Science**, v.78, p. 1921-1931, 1995.

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

MORALES-ROURA, J.S.; ZARCO, L.; HERNANDEZ-CERON, J.; RODRIGUEZ, G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeatbreeding dairy cows. **Theriogenology**, v.55, p.1831-1841, 2001.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, p.1371-1387, 2002a.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.895-907, 2002b

MOREIRA, F.; RISCO, C.A.; PIRES, M.F.; AMBROSE, J.D.; DROST, M.; THATCHER, W.W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1237-1247, 2000.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W.W. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1646-1656, 2001.

ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 35-44, 1998.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético das raças zebus. In:____. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999. p. 198-251.

PETERS, A.R. Embryo mortality in the cow. **Animal Breeding Abstracts**, v. 64, p. 587-598, 1996.

PETERSON, A.J.; LEE, R.S.F. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 687-697, 2003.

PFEIFER, L.F.M.; SCHNEIDER, A.; SILVA NETO, J.W.; ZIGUER, E.A.; DIONELLO, N.J.L.; CORRÊA, M.N. Avaliação biológica e econômica do uso de flunixin meglumine em vacas e novilhas de corte inseminadas em tempo fixo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1392-1397, 2008.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667-681, 1998.

PUGH, M.L.; MOREIRA, M.B.; GILBERT, G.R.; YOUNGS, C.R. Influence of prostaglandin F_{2α} synthesis inhibitors on pregnancy rate of embryo transfer recipient heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15.,

2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 399, (resumo).

PURCELL, S.H.; BEAL, W.E.; GRAY, K.R. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Theriogenology**, v. 64, p. 867–878, 2005.

ROCHE, J.F.; PRENDERVILLE, 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, p.417-418, 1977.

RORIE, R.W.; ROSENKRANS, C.F.; AISHMAN, A.J. Effects of bovine somatotropin treatment on A.I. pregnancy rate in dairy heifers. **Reproduction Fertility Development**, v.16, p.132, 2004 (abstract).

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

SANTOS, J.E.P.; TATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVAO, K.N. The effect embryonic death rates in cattle on the efficacy os estrous synchronization progrms. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p. 513-535, 2004a.

SANTOS, J.E.P.; JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; TATCHER, W.W.; DEI, C.S.; BILBY, C.R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 868-881, 2004.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, supl, p.35-50, 2004.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. 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, p. 2803-2812, 2002.

SCENNA, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; ROHRBACH, N.R.; WEHRMAN, M.E.; SCHRICK, F.N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 8, p. 38-45, 2005.

SIMON, L.S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **American Journal of Medicine**, v. 106, p. 375-425, 1999.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Biosciences**, v. 7, p. 1879-1898, 2002.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproduction Biology Endocrinology**, v. 2, p. 49 (abstract), 2004.

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, p. 367-369, 1975.

STARBUCK, G.R.; DARWASH, A.O.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. In: DISKIN, M.G., fertility in the High Producing Dairy Cow. **BSAS Occasional Publication**, v.26, p. 313-322, 2001.

STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; INSKEEP, E.K.. Maintenance of Pregnancy in Dairy Cattle after Treatment with Human Chorionic Gonadotropin

or Gonadotropin-Releasing Hormone. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3092–3101, 2008.

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

STRONGE, A.J.H.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p. 1212-1224, 2005.

THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Systems to alter embryo survival. Large dairy herd management. **American Dairy Sciences Association**. p. 16-30, 1992.

THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.

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

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

WATHES, D.C.; TAYLOR, V.J.; CHENG, Z.; MANN, G.E. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. **Reproduction**, v.61, Supplement, p.219-237, 2003.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO FLUNIXIN MEGLUMINE, DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA E/OU DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA REDUÇÃO DA MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

Efeito do Flunixin Meglumine, da Somatotropina recombinante Bovina e/ou da Gonadotrofina Coriônica Humana na redução da mortalidade embrionária em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*)

RESUMO - Estratégias farmacológicas são empregadas para reduzir a mortalidade embrionária em fêmeas bovinas. Objetivou-se comparar o efeito do Flunixin Meglumine (FM), Somatotropina Recombinante Bovina (bST) e/ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na redução da mortalidade embrionária em vacas Nelore no período compreendido entre o 15º e 19º dias da gestação, baseando-se na taxa de concepção aos 40 dias de gestação. A hipótese é que vacas tratadas com FM, bST e/ou hCG, apresentam menor mortalidade embrionária e maiores taxas de concepção. Vacas Nelores (n=975), lactantes, com 35 a 70 dias pós-parto, receberam no D-10 um dispositivo intravaginal contendo 1g de Progesterona (DIB®) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol®), via intramuscular (IM). No D-2 o dispositivo foi removido e os animais receberam uma injeção de 112,5µg de D-Cloprostenol (Preloban®); 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon®) e 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP®), todos via IM. Após 48 horas da última injeção (D0), as fêmeas foram submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e sete dias após foram divididas equitativamente em oito grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: não tratadas (Grupo Controle; n= 124); FM no D16 (Grupo FM; n=122); bST no D7 (Grupo bST; n=119); bST no D7 + FM no D16 (Grupo bST+FM; n=121); hCG no D7 (Grupo hCG; n=124); hCG no D7 + FM no D16 (Grupo hCG+FM; n=124); bST e hCG no D7 (Grupo bST+hCG; n=120) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (Grupo bST+hCG+FM; n=121). Utilizou-se 2.500UI de hCG (Chorulon®), IM;

500mg de bST (Boostin®), via subcutânea, na fossa ísqueo-retal e 2,2mg/Kg de FM (Banamine®), IM. Amostras de sangue foram coletadas no D7 e D16, para mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona (P_4) por radioimunoensaio. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por ultra-som. A variável taxa de concepção foi analisada pelo modelo logístico (GLM) utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS e as concentrações de P_4 foram analisadas por ANOVA (PROC GLM). As taxas de concepção não diferiram entre os tratamentos ($p=0,4995$) e foram de 57,26%; 47,54%; 60,50%; 56,20%; 59,68%; 64,52%; 63,33% e 64,46% para os grupos Controle, FM, bST, bST/FM; hCG; hCG/FM; bST/hCG e bST/hCG/FM; respectivamente. Comparando-se as fêmeas tratadas ou não com hCG, verificou-se maior taxa de concepção nas tratadas (62,99% vs. 55,35%, respectivamente; $p=0,01$). Tal diferença não foi observada entre fêmeas tratadas ou não com bST (61,12% vs. 57,29%, respectivamente; $p=0,21$) e FM (58,20% vs. 60,16%, respectivamente; $p=0,46$). As concentrações plasmáticas de P_4 não diferiram no D7 ($p=0,9081$) e D16 ($p=0,0888$) para os diferentes grupos. As concentrações de P_4 no D7 não diferiram ($p>0,05$) entre vacas prenhes e não prenhes tratadas com hCG, bST ou FM. No D16, em fêmeas tratadas com hCG, as concentrações de P_4 foram maiores em fêmeas prenhes quando comparadas as não prenhes ($10,62 \pm 0,39$ vs. $9,55 \pm 0,37$, respectivamente; $p=0,0503$). Conclui-se que vacas tratadas com 2.500UI de hCG sete dias após a IATF, apresentam menor mortalidade embrionária e maiores taxas de concepção aos 40 dias de gestação.

Palavras-chave: Antiinflamatórios, Bovinos, Concepto, Corpo Lúteo, Progesterona

EFFECT OF FLUNIXIN MEGLUMINE, RECOMBINANT SOMATOTROPIN BOVINE AND / OR HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN REDUCING MORTALITY EMBRYO IN NELORE (BOS TAURUS INDICUS)

SUMMARY - Pharmacologic strategies are employed to reduce the embryonic mortality in bovine females. The aim of the study was to compare the effect of Flunixin Meglumine (FM), Recombinant Bovine Somatotropin (bST) and/or Human Corionic Gonadotropin (hCG) on the reduction of embryonic mortality in Nelore cows in the period between the 15th and 19th days of gestation, based on conception rate at 40 days gestation. The hypothesis is that, cows treated with FM, bST and/or hCG, show lower embryo mortality and greater conception rates. Lactating Nelore cows (n=975), 35 to 70 days postpartum, received on D-10 an intravaginal device containing 1g of Progesterone (DIB®) associated with an injection of 2mg of estradiol benzoate (Gonadiol®), i.m. On D -2 the device was removed and the animals received one injection of 112,5µg of D-Cloprostenol (Preloban®); 300UI of Equine Chorionic Gonadotropin (Folligon®) and 1mg of Estradiol Cipionate (ECP®), all through i.m. route. After 48 hours from the last injection (D0), the cows were submitted to Fixed Timed Artificial Insemination (FTAI) and seven days later were divided equitably in eight groups and received one of the following treatments: untreated (Group Control; n=124); FM on D16 (Group FM; n=122); bST on D7 (Group bST; n=119); bST on D7 + FM on D16 (Group bST+FM; n=121); hCG on D7 (Group hCG; n=124); hCG on D7 + FM on D16 (Group hCG+FM; n=124); bST and hCG on D7 (Group bST+hCG; n=120) or bST and hCG on D7 + FM on D16 (Group bST+hCG+FM; n=121). Used 2.500UI of hCG (Chorulon®), IM; 500mg of bST (Boostin®), through subcutaneous route, on the ischiorectal fossa and 2,2mg/Kg of FM (Banamine®), i.m. Blood samples were collected on D7 and D16, to measure plasmatic progesterone (P₄) concentration through radioimmuneassay. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound exam 40 days after FTAI. The variable rate design was analyzed by logistic model (GLM)

using the GLIMMIX procedure of SAS and the values of P_4 were transformed to square root and analyzed by ANOVA (PROC GLM). There was no difference in conception rates for the different treatments ($p = 0.4995$), which were 57.26%, 47.54%, 60.50%, 56.20%, 59.68%, 64.52 %, 63.33% and 64.46% for groups Control, FM, bST, bST/FM, hCG, hCG/FM, bST and bST/hCG/FM, respectively. However, when the conception rate was evaluated considering all the females treated or not with hCG, a higher rate of conception on the treated animals was noted (62.99% vs. 55.35% respectively, $p = 0.01$). This difference was not observed among females treated or untreated with bST (61.12% vs. 57.29% respectively, $p = 0.21$) and FM (58.20% vs. 60, 16% respectively, $p = 0.46$). Plasma concentrations of P_4 did not differ in D7 ($p = 0.9081$) and D16 ($p = 0.0888$) for the different groups. Concentrations of P_4 in D7 did not differ ($p > 0.05$) among non-pregnant cows and heifers treated with hCG, bST or FM. The D16, in females treated with hCG, the concentrations of P_4 were greater in female pregnant compared to non-pregnant (10.62 ± 0.39 vs. 9.55 ± 0.37 , respectively; $p = 0.0503$). It was concluded that cows treated with hCG 2.500UI seven days after TAI, have lower embryo mortality and higher conception rates at 40 days of gestation.

Key words: Antiinflammatories, Bovine, Concepto, Corpus luteum, Progesterone

1 JUSTIFICATIVA

A lucratividade no sistema de produção pecuária exige práticas eficientes de manejo para a obtenção de uma satisfatória rentabilidade (BÓ et al. 2003). Para um rebanho comercial de cria obter máxima produtividade, almeja-se que a fêmea produza um bezerro/vaca/ano (BARUSELLI et al., 2001). O período de gestação médio de 290 dias das fêmeas zebuínas determina um período de acasalamento de até 75 dias após o parto para que o almejado intervalo de partos de 365 dias seja alcançado. Tal limitação ainda deve ser associada ao fato de que, no início da estação de monta, 83,2 % das vacas encontram-se em anestro, segundo Meneguetti et al. (2005).

Em 2007, o rebanho nacional era composto por 68.809.867 matrizes, destas 55.639.882 eram vacas e 13.169.985 novilhas com mais de 24 meses. No ano seguinte, o Brasil produziu 44.110.000 bezerros (ANUALPEC, 2009). Estabelecendo uma relação entre o número de matrizes em idade reprodutiva e o número de bezerros nascidos, estima-se uma produção nacional média de 0,64 bezerro/matriz/ano. 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. Além de tais estimativas, deve-se salientar que no Brasil, nos últimos seis anos, houve uma grande agregação ao valor do bezerro ao desmame, que passou de um preço de US\$18,8 dólares/cabeça em 2003 para US\$47,3 em 2008, aumento estimado em 251% (ANUALPEC, 2009). Desta forma, conclui-se que a baixa eficiência na produção de bezerros nascidos reduz a lucratividade e a competitividade do setor pecuário.

Na tentativa de otimizar o acasalamento da fêmea de corte até 75 dias após a parição, Baruselli et al. (2002) relataram que a IATF possibilita que vacas sejam inseminadas e se tornem prenhas no início da estação de monta, diminuindo o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho. Os mesmos autores realizaram uma comparação entre a IATF e a IA convencional e verificaram que a IATF reduziu em 39,3 dias o período de

serviço. A concentração de nascimentos no início da estação de parição foi associada a desmama de animais mais pesados, antecipação da concepção na estação de monta seguinte e menor taxa de descarte das matrizes ao final da estação de monta.

Um dos principais fatores causadores da baixa fertilidade em bovinos, de corte ou de leite, são as perdas embrionárias que podem alcançar taxas superiores a 40% (HUMBLOT, 2001; SANTOS et al., 2004a; VANROOSE et al., 2000). Dunne et al. (2000) relataram que a mortalidade embrionária é a maior fonte de prejuízos nas operações pecuárias e, em animais de corte, tais perdas embrionárias estão diretamente relacionadas à redução nas taxas de desfrute do rebanho e lento progresso genético.

Em fêmeas bovinas, durante o período crítico compreendido entre os dias 15 e 19 de gestação, o concepto (embrião e membranas associadas) deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio inibindo a síntese de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e a luteólise, condição determinante para o estabelecimento da prenhez. Contudo, a simples existência do concepto no útero não assegura o bloqueio efetivo da luteólise. Para que ocorra o estabelecimento da gestação é necessária a presença de um embrião bem desenvolvido no corno uterino ipsolateral ao ovário que apresenta CL funcional antes do momento do reconhecimento materno da gestação (ROBERTS et al., 1992). Caso tal bloqueio não seja realizado com êxito a regressão funcional e estrutural do CL é desencadeada pela ocorrência de cinco a oito pulsos de $PGF2\alpha$ liberados pelo endométrio durante um período de 2 a 3 dias (FREDRICKSON et al., 1984).

A determinação de estratégias efetivas que possam minimizar a mortalidade embrionária entre o 15º e 19º dia de gestação certamente reduziria as perdas econômicas registradas durante tal período crítico. Diante deste contexto, algumas estratégias farmacológicas podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária. De maneira geral, tais estratégias objetivam minimizar a capacidade de síntese de $PGF2\alpha$ no endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo

concepto. Alguns princípios farmacológicos podem ser utilizados para cumprir tais objetivos.

O presente estudo tem como objetivo geral comparar o uso do Flunixin Meglumine (FM), Somatotropina Recombinante Bovina (bST) e/ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na redução da mortalidade embrionária em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), baseando-se na taxa de concepção aos 40 dias de gestação. Constituem os objetivos específicos do presente estudo: a) comparar as taxas de concepção das fêmeas tratadas com FM, bST e/ou hCG aos 40 dias de gestação; b) comparar as concentrações plasmáticas de progesterona (P_4) sete e dezesseis dias após a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em fêmeas tratadas com FM, bST e/ou hCG e c) correlacionar as concentrações plasmáticas de P_4 mensuradas sete e dezesseis dias após a IATF com a taxa de concepção das fêmeas, independentemente do tratamento farmacológico recebido após a IATF.

A hipótese do presente estudo é que vacas tratadas FM, bST e/ou hCG, apresentam menor mortalidade embrionária, portanto maiores taxas de concepção aos 40 dias de gestação.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Local do Experimento. O experimento foi conduzido em duas fazendas distintas. A primeira foi a Fazenda Jacareúna, localizada no município de São Félix do Araguaia, no estado do Mato Grosso, Brasil, latitude 11°37'02" sul, longitude 50°40'10" oeste e altitude de 195m. A segunda foi a Fazenda Guanabara, localizada no município de Andradina, no estado de São Paulo, Brasil, latitude 20°53' sul, longitude 51°22' oeste e altitude de 387m.

2.2 Período. O experimento na Fazenda Jacareúna foi realizado de janeiro/2009 a março/2009, com um total de 391 fêmeas. As fêmeas foram divididas em três lotes de trabalho, sendo os dois primeiros lotes inseminados em 07/02/2009 e o terceiro em 11/02/2009. O diagnóstico de gestação foi realizado em março/2009. O experimento conduzido na Fazenda Guanabara, foi executado de outubro/2009 a fevereiro/2010, com um total de 584 fêmeas Nelore PO, distribuídas em sete lotes de trabalho. O primeiro lote foi inseminado em 16/10/2009 e o último em 16/01/2010. O diagnóstico da gestação foi realizado em fevereiro/2010.

2.3 Animais. No presente estudo foram utilizadas 975 fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*), primíparas (n=244) e pluríparas (n=731), que tiveram a sincronização dos estros iniciada entre o 35º e 70º dias após o parto. Foram utilizadas fêmeas com uma média e erro padrão de escore de condição corporal (ECC) de $2,815 \pm 0,507$, numa escala de 1 a 5, sendo a classificação 1 para caquética e 5 para obesa, segundo Lowman (1976), conforme representado nas Figuras 4 e 5. As fêmeas foram mantidas em piquetes formados por *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Panicum maximum* cv. Tanzânia e *Panicum maximum* Jacq cv. Colonião. Receberam sal mineral e água *ad libidum*. As condições de utilização dos animais no experimento estavam em concordância com as normas éticas, segundo julgamento da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de

Zootecnia da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Dracena/SP, Brasil (Processo nº 002/2008).



FIGURA 1 - Lote de fêmeas Nelore com 35 a 45 dias pós parto. Fazenda Jacareúna, São Félix do Araguaia - MT, Fevereiro/2009



FIGURA 2 - Lote de fêmeas Nelore multíparas com 40 a 70 dias pós partos. Fazenda Guanabara, Andradina - SP, Novembro/2009



FIGURA 3 - Lote de fêmeas Nelore primíparas com 35 a 50 dias pós parto. Faz. Guanabara, Andradina - SP, Janeiro/2010

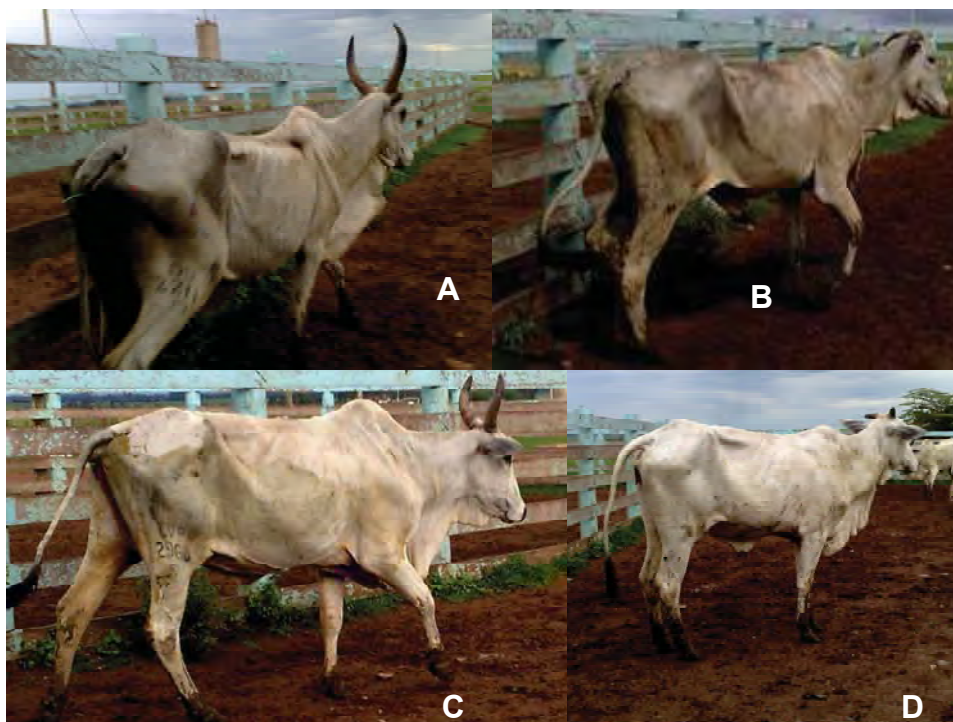


FIGURA 4 - Classificação dos escores de condição corporal (ECC) em vacas Nelore, considerados no presente estudo: (A) ECC 2,0; (B) ECC 2,25; (C) ECC 2,50; (D) ECC 2,75

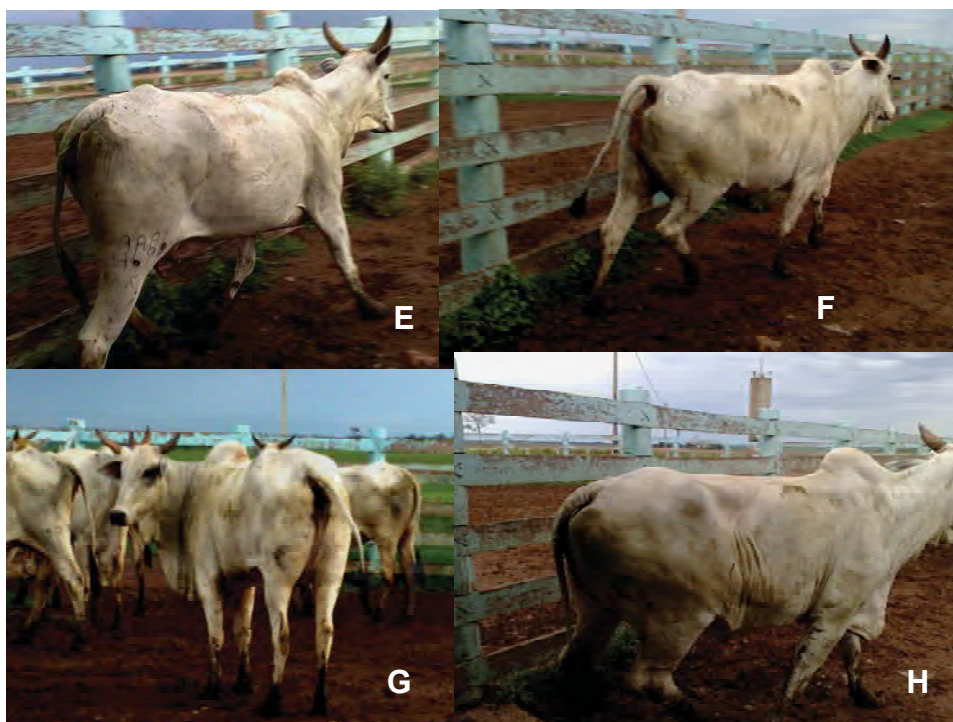


FIGURA 5 - Classificação dos ECC em vacas Nelore, considerados no presente estudo: (E) ECC 3,0; (F) ECC 3,50; (G) ECC 4,0 e (H) ECC 4,5

2.4 Manejo Sanitário. As fêmeas utilizadas no presente estudo foram submetidas ao exame anual de Brucelose e ao teste intradérmico caudal para Tuberculose. Os animais utilizados foram vacinados contra Febre Aftosa em novembro e maio, Clostridiose em novembro e agosto e Pasteurelose e Paratifo no período peri-parto. As fêmeas também receberam a vacina anual para IBR/BVD. Os endoparasitas foram controlados no início da estação de monta, com Avermectina.

2.5 Indução da ovulação. O protocolo para a realização da IATF foi iniciado em dias aleatórios do ciclo estral e encontra-se representado na Figura 6. As vacas tiveram os estros sincronizados pelo uso de um dispositivo contendo 1g de Progesterona (DIB® - Intervet Schering-Plough) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol® - Intervet Schering-Plough) via IM. O dia da colocação do dispositivo foi considerado o D -10. No D -2 o dispositivo foi retirado e os animais receberam uma injeção de 112,5µg de D-Cloprostenol (Preloban® - Intervet Schering-Plough); 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon® -Intervet Schering-Plough) e 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP® - Pfizer), todos via IM. Após 48 horas da última injeção (D0), as vacas foram submetidas à IATF.

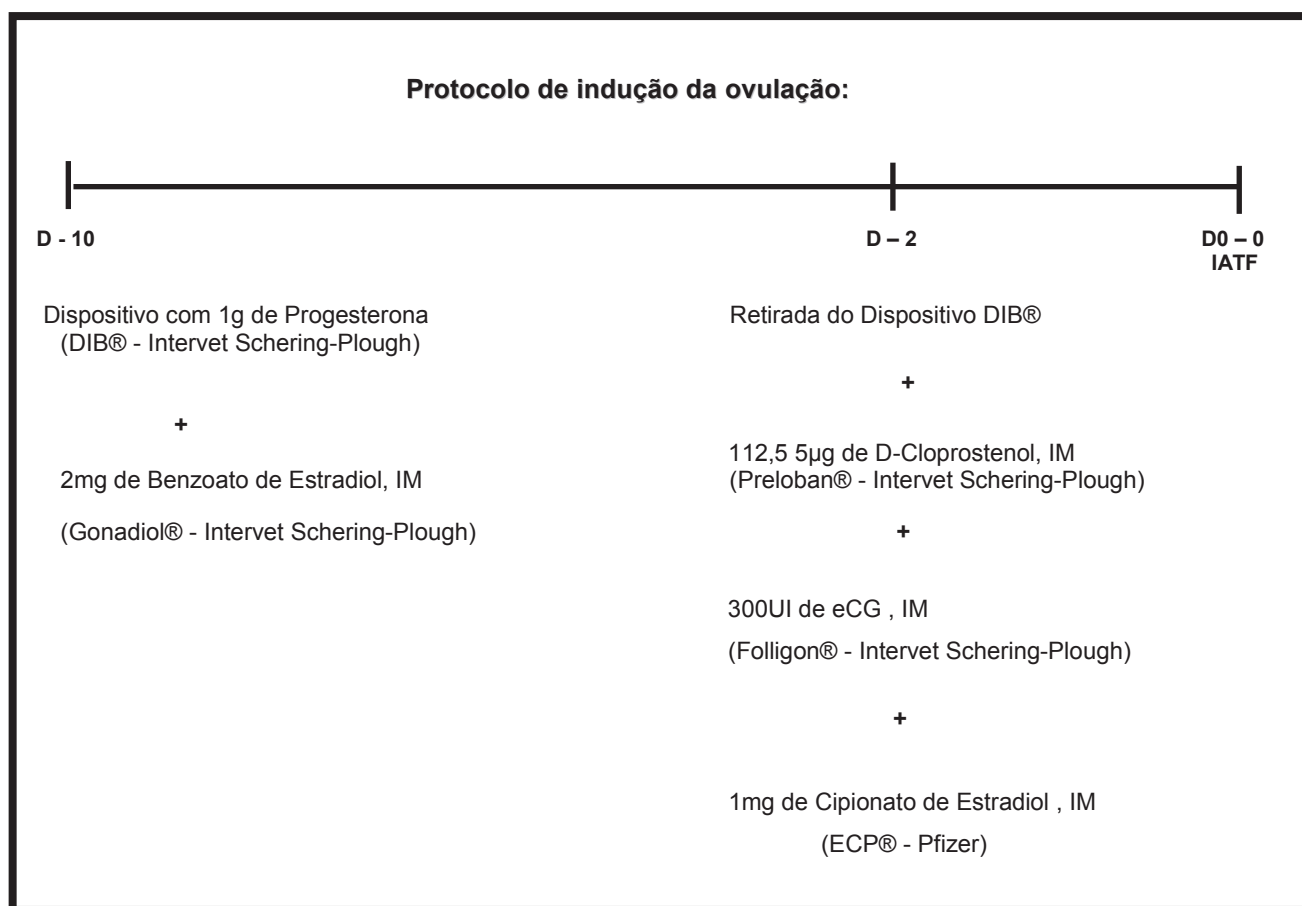
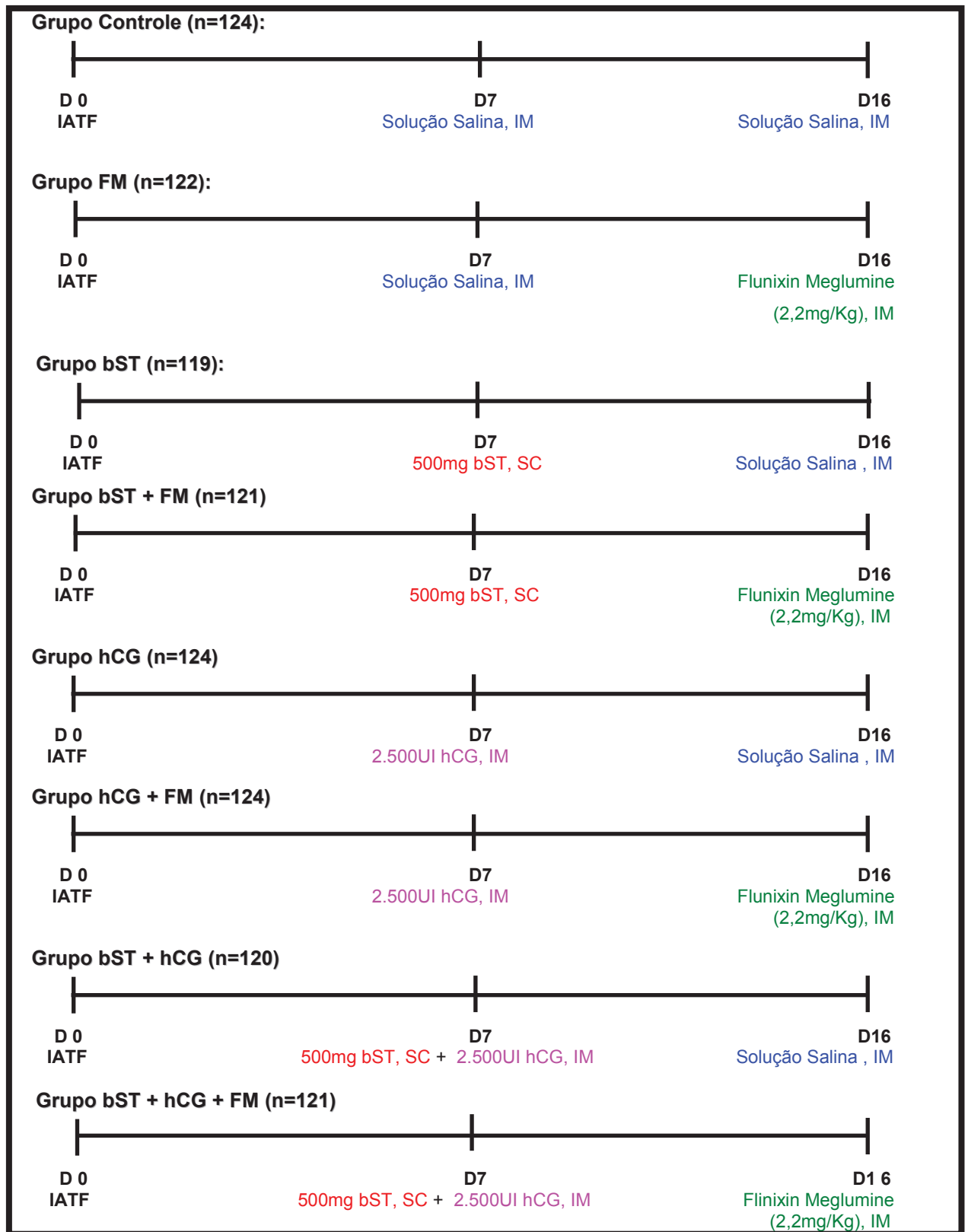


FIGURA 6 - Protocolo de indução da ovulação: (D -10) colocação de um dispositivo intravaginal contendo 1g de Progesterona (DIB® - Intervet Schering-Plough) associado a uma injeção de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol® - Intervet Schering-Plough) via IM; (D - 2) retirada do dispositivo intravaginal + associado à injeção de 112,5µg de D-Cloprostenol (Preloban® - Intervet Schering-Plough); 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon® -Intervet Schering-Plough) e 1mg de Cipionato de Estradiol (ECP® - Pfizer), todos via IM e (D0) após 48 horas da última injeção as vacas foram submetidas à IATF

2.6 Inseminação Artificial. Para a realização da IATF foi utilizado o sêmen de touros, com características morfológicas e funcionais dentro dos padrões andrológicos recomendados. Na fazenda Jacareúna, foram utilizados quatro touros, sendo dois da raça Simental e dois da raça Nelore. Na fazenda Guanabara foram utilizados 15 touros, da raça Nelore. O sêmen de cada touro foi distribuído equitativamente entre os diferentes grupos de tratamento. A inseminação foi realizada por dois técnicos na fazenda Jacareúna e por dois técnicos na fazenda Guanabara. Os técnicos foram equitativamente distribuídos entre os diferentes grupos de tratamento.

2.7 Aplicação dos Tratamentos. Após a realização da IATF, as fêmeas (n=975) foram divididas equitativamente em oito grupos, segundo o período pós-parto, ECC e sêmen. No D7 as vacas receberam um dos seguintes tratamentos (Figura 7): Solução Salina (SS) no D7 + SS no D16 (Grupo Controle; n= 124); SS no D7 + FM no D16 (Grupo FM; n=122); bST no D7 + SS no D16 (Grupo bST; n=119); bST no D7 + FM no D16 (Grupo bST + FM; n=121); hCG no D7 + SS no D16 (Grupo hCG; n=124); hCG no D7 + FM no D16 (Grupo hCG + FM; n=124); bST e hCG no D7 + SS no D16 (Grupo bST + hCG; n=120) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (Grupo bST + hCG + FM; n=121). A SS foi aplicada no volume de 2,5mL, IM. A hCG comercial utilizada foi o Chorulon® (Intervet Schering-Plough), na dose de 2.500UI (KASTELIC; AMBROSE, 2004), IM. A bST foi o Boostin® (Intervet Schering-Plough) administrado na dose de 500mg/animal (MOREIRA et al. 2000; MOREIRA et al. 2001; MOREIRA et al., 2002a), via SC na fossa ísqueo-retal. A dose de FM (Banamine®; Intervet Schering-Plough) recomendada na literatura é de 1,1 mg/Kg PV, sendo realizadas duas injeções, com intervalos de 12 horas (GUZELOGLU et al., 2007; PUGH et al., 2004), entretanto, considerando que no presente estudo seria realizada uma única aplicação de FM, julgou-se pertinente a utilização da dose de 2,2 mg/Kg PV.



2.8 Coleta de Amostras de Sangue. Para a avaliação da concentração plasmática de P_4 no referido experimento, 44% das fêmeas do rebanho experimental de cada grupo tiveram amostras de sangue coletadas, conforme representado na Tabela 3. As coletas de sangue foram realizadas no D7 e no D16 após a IATF. Aproximadamente 4mL de sangue foi coletado com seringa por venopunção da veia ou artéria caudal mediana. O sangue foi cuidadosamente depositado em um tubo de vidro contendo 175 μ L de citrato de sódio a 30%. Em seguida, o tubo foi invertido lentamente repetidas vezes até que fosse suficientemente homogeneizado com o citrato de sódio. Os tubos foram acondicionados a 4°C até que fossem centrifugados. As amostras foram submetidas à centrifugação a 2900 x g, durante 30 minutos, em temperatura ambiente (Centrífuga Centribio, modelo 80-2B). Após a centrifugação, o plasma foi removido, acondicionado em microtubos e armazenado a -20° C, até a realização da técnica de radioimunoensaio.

2.9 Radioimunoensaio para a mensuração de Progesterona. A mensuração das concentrações plasmáticas de P_4 foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, na cidade de Araçatuba, no estado de São Paulo, Brasil. As concentrações de P_4 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 (RCA) e baixas (RCB) de P_4 . Para a referência RCA, os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 1,60%; 1,56% e 1,39%, para os ensaios 1, 2 e 3. Para a referência RCB, os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 0,10%; 0,05% e 0,03%, para os ensaios 1, 2 e 3. O coeficiente inter-ensaio foi 5,30% para a RCA e 2,95% para a RCB. 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.

2.10 Diagnóstico de Gestação. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF através de exame ultra-sonográfico (Aloka Ultrasound Diagnostic Equipament, Modelo SSD-500, Tokyo-Japão) com transdutor linear de 5mHz,

2.11 Análise Estatística. A variável resposta, taxa de concepção aos 40 dias após a IATF, obtida no experimento descrito, trata-se de uma variável binária, isto é, uma variável cujo valor observado pode ser representado por 0 ou 1. Em geral, assume-se que uma variável deste tipo possui distribuição Bernoulli, um caso particular de modelos lineares generalizados (DEMETRIO, 2001). Supondo que Y_i , $i=1, 2, \dots, n$, representa uma das variáveis medidas e que $Y_i \sim \text{Bernoulli}(\pi_i)$, sendo π_i a probabilidade de sucesso (probabilidade de prenhez) a função de probabilidade de Y_i , é calculada por:

$$P(Y_i = y_i) = \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i}, \quad y_i=0,1$$

As variáveis independentes, incluídas inicialmente no modelo estatístico, foram os efeitos de lote, ECC, FM, bST e hCG e as possíveis interações entre as referidas variáveis nos grupos de tratamento. Para a obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram seqüencialmente removidas, através do critério estatístico de Wald, utilizando o valor de $p > 0,20$ como critério de remoção. As variáveis explanatórias incluídas no modelo final foram os efeitos de lote ($p=0,003$) e tratamento com hCG ($p=0,01$). A taxa de concepção aos 40 dias após a IATF foi analisada utilizando a regressão logística, utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Institute, 2004). As variáveis respostas contínuas, concentração de P_4 no D7 e a concentração de P_4 no D16, foram testadas quanto à normalidade dos resíduos (Teste Shapiro-Wilk, $p \leq 0,01$) e a homogeneidade das variâncias (Teste F; $p \leq 0,01$), utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS (SAS Institute, 2004) e se mostraram adequadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo PROC GLM do programa SAS (SAS Institute, 2004). Todas as variáveis contínuas estão expressas pela média como medida de tendência

central e o desvio padrão como medida de dispersão dos dados. O nível de significância utilizado para todos os dados obtidos foi de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Taxas de concepção

As taxas de concepção aos 40 dias após a IATF estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença significativa nas taxas de concepção para os diferentes grupos de tratamento ($p>0,05$).

Tabela 1- Taxa de concepção 40 dias após a IATF, em vacas Nelore no período pós-parto, submetidas aos seguintes tratamentos: não tratadas (Controle); Flunixin Meglumine no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF

Grupo de Tratamento	n	ECC Média $\pm$ erro padrão	Taxa de Concepção
Controle	124	2,76 $\pm$ 0,47	57,26%
FM	122	2,79 $\pm$ 0,51	47,54%
bST	119	2,78 $\pm$ 0,46	60,50%
bST + FM	121	2,80 $\pm$ 0,49	56,20%
hCG	124	2,82 $\pm$ 0,46	59,68%
hCG + FM	124	2,83 $\pm$ 0,49	64,52%
bST + hCG	120	2,85 $\pm$ 0,54	63,33%
bST + hCG + FM	121	2,84 $\pm$ 0,59	64,46%
p			0,4995

Não foi observado incremento nas taxas de concepção comparando todas as fêmeas tratadas com bST e/ou FM e as não tratadas; $p>0,05$. Entretanto, quando se avaliaram todos os animais tratados ou não com hCG, verificou-se que o tratamento com hCG, combinado ou não a bST e/ou FM, aumentou a taxa de concepção comparado às fêmeas que não receberam hCG $p\leq 0,01$, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2- Taxa de concepção (%) 40 dias após a IATF, em vacas Nelore no período pós-parto, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG, n= 489) no D7; tratadas ou não com Somatotropina Recombinante Bovina (bST, n= 481) no D7 e tratadas ou não com Flunixin Meglumine (FM, n= 488) no D16, sendo D0 o dia da IATF

Fármaco	Dose	Condição	n	Taxa Concepção	Probabilidade
hCG	2.500UI, IM	Sem hCG	486	55,35% (269/486) ^b	p=0,01
		Com hCG	489	62,99% (308/489) ^a	
bST	500mg, SC	Sem bST	494	57,29% (283/494)	p=0,21
		Com bST	481	61,12% (294/481)	
FM	2,2mg/Kg, IM	Sem FM	487	60,16% (293/487)	p=0,46
		Com FM	488	58,20% (284/488)	

^{a,b} Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna, para um mesmo tratamento, diferem estatisticamente ($p\leq 0,01$)

3.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA NO D7

As concentrações plasmáticas de P_4 no D7 para os diferentes grupos de tratamento estão representadas na Tabela 3. No presente estudo, não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de P_4 sete dias após a IATF ($p>0,05$).

Tabela 3- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P_4 (ng/mL) no D7, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, submetidas aos tratamentos: não tratadas (Controle); FM no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF

Grupo de Tratamento	n	Concentração Plasmática de P_4 (ng/mL) no D7
		Média $\pm$ erro padrão
Controle	47	4,73 $\pm$ 0,33
FM	48	5,15 $\pm$ 0,32
bST	48	5,48 $\pm$ 0,38
bST + FM	49	5,19 $\pm$ 0,39
hCG	47	5,64 $\pm$ 0,45
hCG + FM	47	5,07 $\pm$ 0,43
bST + hCG	46	5,18 $\pm$ 0,33
bST + hCG + FM	50	5,18 $\pm$ 0,37
p		0,9081

3.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA NO D16

As concentrações plasmáticas de P_4 no D16 para os diferentes grupos de tratamento estão representadas na Tabela 4. No presente estudo, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de P_4 dezesseis dias após a IATF para os diferentes grupos de tratamento.

Tabela 4 - Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P_4 (ng/mL) no D16, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, submetidas aos tratamentos: não tratadas (Controle); FM no D16 (FM); bST no D7 (bST); bST no D7 + FM no D16 (bST + FM); hCG no D7 (hCG); hCG no D7 + FM no D16 (hCG + FM); bST e hCG no D7 (bST + hCG) ou bST e hCG no D7 + FM no D16 (bST + hCG + FM), considerando o D0 como o dia da IATF

Grupo de Tratamento	n	Concentração Plasmática de P_4 (ng/mL) no D16
		Média $\pm$ erro padrão
Controle	47	8,66 $\pm$ 0,72
FM	48	9,11 $\pm$ 0,65
bST	48	11,39 $\pm$ 0,85
bST + FM	49	9,02 $\pm$ 0,74
hCG	47	10,80 $\pm$ 0,78
hCG + FM	47	10,46 $\pm$ 0,88
bST + hCG	46	10,70 $\pm$ 0,73
bST + hCG + FM	50	10,53 $\pm$ 0,77
p		0,0888

3.4 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA NO D7 E D16 SOBRE AS TAXAS DE CONCEPÇÃO

Para as fêmeas tratadas com hCG, as concentrações plasmáticas de P_4 no D7 não diferiram ($p>0,05$) entre as fêmeas que se tornaram prenhes ou não, sendo de $5,27 \pm 0,20\text{ng/mL}$ para as prenhes e $5,41 \pm 0,18\text{ng/mL}$ para as não prenhes. Para as fêmeas tratadas ou não com bST, as concentrações plasmáticas de P_4 no D7 não diferiram ($p>0,05$) entre as fêmeas que se tornaram prenhes ou não 40 dias após a IATF, sendo de $5,26 \pm 0,18\text{ng/mL}$ para as prenhes e $5,15 \pm 0,19\text{ng/mL}$ para as não prenhes. Para as fêmeas tratadas ou não com FM, as concentrações plasmáticas de P_4 no D7 não diferiram ($p>0,05$) entre as fêmeas que se tornaram prenhes ou não 40 dias após a IATF, sendo de $5,15 \pm 0,18\text{ng/mL}$ para as prenhes e $5,26 \pm 0,19\text{ng/mL}$ para as não prenhes.

Tabela 5- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P_4 (ng/mL) no D7, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, de fêmeas prenhes ou não, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) no D7; Somatotropina Recombinante Bovina (bST) no D7 e Flunixin Meglumine (FM) no D16, sendo o D0 o dia da IATF

Fármacos	Condição	Concentração Plasmática de P_4 (ng/mL) no D7
		Média $\pm$ erro padrão
hCG	Prenhe (n=190)	$5,27 \pm 0,20$
	Não Prenhe (n=192)	$5,14 \pm 0,18$
	Probabilidade	$p=0,6393$
bST	Prenhe (n=193)	$5,26 \pm 0,18$
	Não Prenhe (n=189)	$5,15 \pm 0,19$
	Probabilidade	$p=0,6836$
FM	Prenhe (n=194)	$5,15 \pm 0,18$
	Não Prenhe (n=188)	$5,26 \pm 0,19$
	Probabilidade	$p=0,6875$

Para as fêmeas tratadas com hCG, as concentrações plasmáticas de P_4 no D16 foram maiores ($p \leq 0,0503$) para as fêmeas que se tornaram prenhes quando comparadas as não prenhes ($10,62 \pm 0,39 \text{ ng/mL}$ vs. $9,55 \pm 0,37 \text{ ng/mL}$, respectivamente). Para as fêmeas tratadas com bST, as concentrações plasmáticas de P_4 no D16 não diferiram entre as fêmeas que se tornaram prenhes e foram de $10,40 \pm 0,39 \text{ ng/mL}$ ($p = 0,33$) para as prenhes e $9,76 \pm 0,38 \text{ ng/mL}$ para as não prenhes. Para as fêmeas tratadas com FM, as concentrações plasmáticas de P_4 no D16 não diferiram entre as fêmeas e foram de $9,78 \pm 0,38 \text{ ng/mL}$ para as prenhes e $10,40 \pm 0,39 \text{ ng/mL}$ ($p = 0,25$) para as não prenhes.

Tabela 6- Média e erro padrão da média, das concentrações plasmáticas de P_4 (ng/mL) no D7 e D16, em vacas Nelore no período pós-parto, mensurada em aproximadamente 40% das fêmeas de cada grupo experimental, de fêmeas prenhes ou não, tratadas ou não com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) no D7; Somatotropina Recombinante Bovina (bST) no D7 e Flunixin Meglumine (FM) no D16, considerando como D0 o dia da IATF

Fármacos	Condição	Concentração Plasmática de P_4 (ng/mL) no D16
		Média $\pm$ erro padrão
hCG	Prenhe (n=190)	$10,62 \pm 0,39^a$
	Não Prenhe (n=192)	$9,55 \pm 0,37^b$
	Probabilidade	$p=0,0503$
bST	Prenhe (n=193)	$10,40 \pm 0,39$
	Não Prenhe (n=189)	$9,76 \pm 0,38$
	Probabilidade	$p=0,2364$
FM	Prenhe (n=194)	$9,78 \pm 0,38$
	Não Prenhe (n=188)	$10,40 \pm 0,39$
	Probabilidade	$p=0,2534$

^{a,b} Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna, para um mesmo tratamento, diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$)

4 DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO FM, bST E hCG NAS TAXAS DE CONCEPÇÃO

No presente estudo, embora não tenha havido aumento significativo nas taxas de concepção para os diferentes grupos de tratamento ($p>0,05$), conforme representado na Tabela 1, verificou-se que o tratamento com hCG, combinado ou não ao bST e/ou FM, aumentou a taxa de concepção [62,99% (308/489) vs. 55,35% (269/486); $p=0,01$], conforme representado na Tabela 2. De fato, diversos autores relataram incrementos significativos na taxa de prenhez de vacas leiteiras tratadas com hCG após a IA (BELTRAN et al., 2003; SANTOS et al., 2001; SIANANGAMA; RAJAMAHENDRAN, 1992). Em outros estudos, embora a hCG tenha promovido incremento nas concentrações circulantes de P_4 , a mesma não aumentou a taxa de prenhez (CHAGAS; SILVA, 2005; FUNSTON et al. 2005; MACHADO et al., 2004; STEVENSON et al., 2008). Chagas e Silva et al. (2005) trataram novilhas leiteiras com 1500 UI de hCG no D7 e não observaram incremento na taxa de gestação. Possivelmente, tal resultado deu-se em razão da menor dose de hCG utilizada quando comparada aos demais estudos.

No presente estudo, não foi observado incremento nas taxas de concepção considerando todas as fêmeas tratadas e não tratadas com bST [61,12% (294/481) vs. 57,29% (283/494); $p>0,05$], conforme representado na Tabela 2. Thatcher e Hansen (1992) encontraram conceptos com comprimentos variando de 15 a 250mm, no 17º dia de gestação, em vacas de leite. Os mesmos autores verificaram que conceptos menores não são capazes de sintetizar IFN em quantidade suficiente para enviar sinais anti-luteolíticos apropriados ao endométrio materno para bloquear a luteólise. Desta forma, no presente estudo o bST deveria ter promovido uma aceleração no crescimento embrionário e aumento no número de células trofoblásticas resultando em aumento na secreção de IFN pelo embrião (MOREIRA et al., 2000), evento que o tornaria mais competente para inibir o processo de luteólise (MANN; LAMMING, 2001), levando ao incremento na taxa de gestação. De fato,

Thatcher et al. (2006) verificaram um aumento na concentração de IFN no fluido uterino quando fêmeas foram tratadas com 500mg de bST.

Os receptores para a bST e IGF-1 estão presentes no endométrio de vacas (WATHES et al., 1998) e em alta concentração nas glândulas endometriais. Sugere-se que o IGF-1 regularia a atividade secretória de tais glândulas (MOREIRA et al., 2002a). Portanto, o aumento nas concentrações de IGF-1 em consequência do tratamento com bST exerceria um efeito estimulatório na atividade secretória das glândulas endometriais. Tal efeito promoveria um ambiente uterino mais favorável ao desenvolvimento do embrião e concepto, facilitando a manutenção da gestação (MOREIRA et al., 2002a). Além disso, o IFN é responsável pela inibição da secreção de $\text{PGF2}\alpha$ oriunda do tecido endometrial (THATCHER et al., 1997), via inibição das enzimas PKC, fosfolipase A2, COX-2 ou inibindo receptores de OT e E_2 (BINELLI, 2000b). Verificou-se que a administração de 500mg de bST no estro promoveu a inibição da síntese $\text{PGF2}\alpha$ e consequentemente retardou o processo de luteólise, resultando em um aumento da taxa de gestação (MOREIRA et al., 2002a).

Mann e Lamming (2001) relataram uma notável correlação entre o tamanho do concepto no período crítico do reconhecimento materno e a quantidade de IFN encontrada no lúmen uterino. Inferiram também que conceptos com menor desenvolvimento estão diretamente associados a baixas quantidades de IFN intra-uterino e, conseqüentemente, associados às falhas no bloqueio da liberação de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio resultando em altos índices de perda embrionária. Desta forma, admite-se que uma boa taxa de desenvolvimento embrionário inicial é extremamente importante para a obtenção de um concepto com grande alongamento no período crítico do reconhecimento materno. O concepto que apresenta maior alongamento durante esse período conseqüentemente apresenta maior área de contato com o lúmen uterino e também maior capacidade de secretar grandes quantidades de IFN tendo assim, maior capacidade de bloquear a lise do CL por reduzir a capacidade de secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio. No presente estudo, o

efeito benéfico da bST nas taxas de concepção não foi evidenciado. A ausência do efeito positivo da bST nas taxas de concepção foi relatado por outros autores, que utilizaram a bST em vacas de leite, em períodos diferentes do preconizado no presente estudo (BELL et al., 2008; BLEVINS et al., 2006). Em outros estudos, também não foi verificado aumento significativo nas taxas de prenhez com a aplicação de 500mg de bST no estro de novilhas receptoras de embrião (FONSECA, 1999; HASLER et al., 2003).

Em discordância com os resultados encontrados em outros estudos, incrementos na taxa de prenhez foram obtidos com a administração de 500mg de bST no estro de fêmeas bovinas (MOREIRA et al. 2000; MOREIRA et al., 2002a), a bST aumentou as taxas de concepção em vacas de leite de alta produção submetidas a IATF (BILBY et al., 2006; MOREIRA et al. 2001; SANTOS et al., 2004), provavelmente em resposta ao aumento na concentração sérica de bST e IGF-1 (Bilby et al., 1999) na fertilização e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al. 2002a; 2002b). Segundo Cushmann et al. (2001), a bST após a sua aplicação persiste na circulação por até três semanas, duplicando a concentração sanguínea de IGF-1. Bilby et al. (2004) relataram um decréscimo nas taxas de concepção em animais tratados com a bST. Conforme representado na Tabela 4, as concentrações plasmáticas de P_4 não diferiram entre as fêmeas prenhes e não prenhes tratadas com bST no D7 ($p=0,6836$) e D16 ($p=0,2364$). No entanto, a utilização de 500mg em novilhas, no quinto dia do ciclo estral, não proporcionou diferenças entre os animais. Além disso, esta mesma dose administrada em novilhas, no terceiro dia do ciclo estral, causou diminuição na concentração de P_4 (BORGES et al., 2001). Esta diminuição possivelmente decorra do aumento no metabolismo e no fluxo sanguíneo hepático causado pela bST e no clearance hormonal (FOXCROFT et al., 2000). No presente estudo, havia a expectativa de que a bST atuasse favorecendo o desenvolvimento do concepto, mas também, determinasse um efeito positivo na atividade luteotrófica do CL. Considerando a aplicação da bST no D7, esperava-se que o aumento de IGF-1, comumente ocasionado pela injeção de bST, promovesse

um maior crescimento do CL. Deve-se salientar que o IGF-1 é um potente agente mitogênico em resposta ao estímulo de GH (COHICK, 1998) e estrategicamente poderia atuar no crescimento do concepto (NAGANO et al., 2004) e no incremento das concentrações plasmáticas de P_4 . Considerando que as concentrações de P_4 não diferiram no D16 entre animais tratados ou não com bST, possivelmente a bST não tenha incrementado o crescimento do CL e sua atividade luteotrófica.

Adicionalmente, Gallo e Block (1991) verificaram que vacas de leite de alta produção em lactação possuem baixa concentração sérica de IGF-1. Assim, o tratamento com bST eleva a concentração de IGF-1, que possui papel importante no aumento da captação e absorção de lipoproteínas e na esteroidogênese das células da camada granulosa e do tecido luteal, estimulando, portanto, a síntese de P_4 (VELDHUIS et al., 1986). No entanto, em vacas de corte, cujas concentrações endógenas de IGF-1 são superiores aos de vacas de leite em lactação, a aplicação de bST pode não determinar os efeitos esperados devido ao limiar de bST e IGF-1 circulante (LUCY et al., 1994) ou até responder negativamente devido a um desequilíbrio endócrino (BORGES et al., 2001).

A ausência de efeito positivo da bST na taxa de prenhez obtida no presente estudo, também pode estar relacionada ao dia de aplicação da bST. A aplicação de somatotropina no estro garante concentrações elevadas de bST e IGF-1 durante 14 dias (BILBY et al., 1999). A ação daqueles hormônios ocorre primeiramente no útero, aumentando as condições uterinas em manter a gestação (HASLER et al., 2003) e, posteriormente, entre o sexto e o 14º dia do desenvolvimento do embrião, que é considerado um período crítico (BILBY et al., 1999). Sendo assim, um tempo superior de exposição do útero à bST e IGF-1, à fecundação, e durante o seu período crítico de desenvolvimento (MOREIRA et al., 2002a), é importante para proporcionar incremento na taxa de prenhez. Desta forma, observa-se que a administração de bST em vacas lactantes, durante o estro, garante um ambiente uterino capaz de estimular o

desenvolvimento embrionário com consequente aumento na taxa de prenhez (MOREIRA et al., 2002a).

O FM é um potente agente antiinflamatório não hormonal, capaz de inibir a COX-2 impedindo a conversão do AA em PGF2 α (ODENSVIK, 1995). A aplicação via IM de FM diminuiu as concentrações plasmáticas de PGFM em vacas não lactantes em 12 horas (GUILBAULT et al., 1987). Este modo de ação e relatos anteriores de taxas de prenhez aumentadas após a IA (MERRILL et al., 2007), ou no momento da transferência de embriões (PURCELL et al., 2005; SCENNA et al., 2005), gerou a expectativa de que o FM conduziria a respostas favoráveis nas taxas de concepção.

No presente estudo, o emprego do FM na dose de 2,2 mg/Kg PV administrado no D16, não promoveu incremento nas taxas de concepção considerando todas as fêmeas tratadas e não tratadas com FM [58,20% (284/488) vs. 60,16% (293/487); $p>0,05$], conforme representado na Tabela 2. Como podem ser observadas na Tabela 3, as concentrações plasmáticas de P₄ não diferiram entre as fêmeas prenhes e não prenhes tratadas com FM no D7 ($p=0,6875$) e D16 ($p=0,2534$).

A diferença no índice de prenhez verificada entre os grupos tratados com antiinflamatório e o grupo controle do experimento difere dos resultados encontrados por Merrill et al. (2003), que observaram maiores taxas de prenhez em vacas tratadas com FM 14 dias após a IA. Porém, neste mesmo experimento, os animais foram induzidos ao estresse, o que poderia evidenciar alguma resposta a aplicação de antiinflamatório, visto que manejos estressantes pós-IA podem induzir a mortalidade embrionária (HANSEN, 2002). Além disso, outros trabalhos (AKÉ LOPEZ et al., 2005; ODEVINSK et al., 1998) confirmaram um aumento no período requerido entre a ovulação e a luteólise, permitindo supor que o fármaco retardasse a luteólise. Tal efeito possibilitaria um maior tempo para que o embrião se desenvolvesse e secretasse quantidades suficientes de IFN para induzir o reconhecimento materno (AKÉ LOPEZ et al., 2005).

Apesar do presente estudo ter sido realizado com o objetivo de relacionar o resultado da concepção à inibição da síntese e/ou liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ no momento do reconhecimento da gestação, não é possível descartar outros fatores que contribuem diretamente para a manutenção da gestação. Vacas submetidas à IATF são mais predispostas a fases luteais de curta duração, pois a ovulação induzida muitas vezes não permite que o útero tenha exposição adequada ao estrogênio no período pré-ovulatório, resultando em aumento da responsividade uterina ao estímulo da OT e em maior liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ resultando em luteólise e, conseqüentemente, maior perda embrionária (MANN; LAMMING, 2000). Bergamaschi (2005) apontou que o manejo intensivo empregado às fêmeas Nelore como a rotação de pastagem em piquetes, arração em cochos, rodeio dos animais para a observação de cios e a contenção das matrizes para a administração dos tratamentos pode implicar em menores taxas de prenhez para vacas inseminadas artificialmente do que para as servidas por touros.

Apesar do conceito secretar quantidades razoáveis de IFN no dia 14, alguns autores sugerem que os pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ atingem seu ponto culminante somente entre os dias 15 e 17 do ciclo estral (BINELLI et al., 2001; MCCRAKEN et al., 1999; THATCHER et al., 1986). Considerando que a meia-vida do FM é de 24 horas (GUILBAULT et al., 1987), possivelmente o dia de aplicação não tenha sido o mais apropriado para inibição da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$. Enfim, para elucidar os eventos relacionados à concepção e melhorar a taxa de prenhez com o uso de FM, são necessários mais estudos relacionados ao melhor momento da aplicação, à dose e ao tempo de uso de tal fármaco.

4.2 Efeito do FM, bST e hCG nas concentrações plasmáticas de progesterona

Diversos estudos relatam que altas concentrações séricas de P_4 no período pós-inseminação imediato favorecem o meio ambiente uterino,

gerando condições mais favoráveis para o desenvolvimento embrionário inicial, produção de IFN e taxa de prenhez em fêmeas bovinas (CARTER et al. 2008; DISKIN et al., 2006; LAMMING et al., 1989; MANN et al., 1999; STARBUCK et al. 2001; STRONGE et al., 2005). Starbuck et al. (2001) avaliaram as concentrações de P_4 no leite de vacas holandesas no 5º dia pós-ovulação e constataram alta correlação entre vacas que apresentaram baixas concentrações de P_4 no dia 5 com menores índices de prenhez. Wathes et al. (2003) sugeriram que um atraso na elevação inicial das concentrações de P_4 medidas no leite estaria relacionado com baixas taxas de prenhez. A partir de tais relatos, sugere-se que fêmeas contendo um CL com capacidade de elevar rapidamente as concentrações de P_4 , assim como mantê-las, favorece um maior desenvolvimento do concepto. Tais conceitos seriam mais competentes em bloquear a luteólise. De fato, Geisert et al. (1988) observaram em fêmeas tratadas com P_4 endógena um aumento na taxa de crescimento embrionário e, conseqüentemente, na capacidade de produzir IFN. Carter et al. (2008) observaram que maiores concentrações séricas de P_4 no período pós-concepção imediato esta associada com um aumento na taxa de crescimento embrionário, produção de IFN e maior taxa de prenhez. Starbuck et al. (2001) verificaram que vacas com adequadas concentrações de P_4 no leite ($> 3\text{ng/ml}$) tiveram taxas de prenhez em torno de 50-55% enquanto vacas com baixas concentrações de P_4 no leite ($<1\text{ng/ml}$) apresentaram taxas de prenhez inferiores a 10%. Diante de tais evidências, supõe-se que maiores concentrações plasmáticas de P_4 a partir do D5 seriam importantes para assegurar maiores taxas de concepção.

Conforme representado na Tabela 3 do presente estudo, as concentrações plasmáticas de P_4 no D7 foram similares para os diferentes grupos de tratamento e tiveram médias e erros padrões que variaram de $4,73 \pm 0,33\text{ng/mL}$ a $5,64 \pm 0,45\text{ng/mL}$. Não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de P_4 no D7 em fêmeas que se tornaram prenhes e não prenhes; com médias e erros padrões que variaram de $5,15 \pm 0,18\text{ng/mL}$ a

5,27 $\pm$ 0,20ng/mL nas prenhes e 5,14 $\pm$ 0,18 a 5,26 $\pm$ 0,19ng/mL nas não prenhes.

Foi suficientemente reportado que o GnRH, o LH e a hCG, administrados quatro a sete dias após o estro, promovem a ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular e a formação de um CL acessório (GOISSIS et al., 2004; KASTELIC; AMBROSE, 2004; MACHADO, 2004; MARQUES et al., 2002; NISHIGAI et al., 2002; SANTOS et al., 2001). Também foram reportadas ações complementares do hCG, que se referem a sua atuação luteotrófica sobre o CL original, aumentando o tamanho das células luteínicas pequenas e grandes (SCHMITT et al. 1996b). A hCG possui meia vida plasmática mais longa comparada ao GnRH e LH, em razão de sua menor degradação no complexo hormônio-receptor. Tal particularidade da hCG promove um estímulo mais prolongado dos receptores de LH nas células alvo de sua ação (NISWENDER et al., 2000). A hCG promove um aumento na proporção das células luteínicas pequenas (BENNETT et al. 1989), aumento no peso do CL (BREUEL et al. 1989), efeitos que, associados, determinam um aumento nas concentrações plasmáticas de P₄ (GOISSIS et al., 2004; MACHADO et al. 2004; MARQUES, 2002; STEVENSON et al., 2007; STEVENSON et al., 2008). A ação luteotrófica da hCG decorre da combinação de seus efeitos sobre o CL original existente no momento de sua aplicação e da formação do CL acessório (MACHADO et al. 2006).

Diante de tal contexto, esperava-se que no presente estudo a administração de hCG sete dias após a IATF promovesse um incremento estratégico na produção de P₄, condição que favoreceria um maior alongamento do conceito durante esse período, maior área de contato do conceito com o lúmen uterino e agregaria ao mesmo maior capacidade de secreção de IFN. Tais eventos associados determinariam maior capacidade ao conceito no bloqueio da síntese de PGF2 α endometrial e maior probabilidade de manter a gestação.

O presente estudo não avaliou a dinâmica folicular das fêmeas para confirmar a ovulação do folículo dominante do D7 e, posteriormente, a

presença de um CL acessório em fêmeas submetidas ao tratamento com hCG. Entretanto, no presente estudo, esperava-se observar o efeito luteotrófico do hCG na promoção do aumento das concentrações plasmáticas de P_4 no D16, nove dias após a sua aplicação. No presente estudo o hCG não promoveu incremento nas concentrações plasmáticas de P_4 no D16, entretanto, as fêmeas tratadas com hCG que se tornaram prenhes, apresentaram maiores concentrações de P_4 comparada as não prenhes ($10,62 \pm 0,39\text{ng/mL}$ vs. $9,55 \pm 0,37\text{ng/mL}$; $p \leq 0,05$), conforme ilustrado na Tabela 6. As concentrações médias dos grupos tratados com hCG variaram de $10,46 \pm 0,88\text{ng/mL}$ a $10,80 \pm 0,78\text{ng/mL}$, enquanto nos grupos não tratados as concentrações variaram de $8,66 \pm 0,72\text{ng/mL}$ a $11,39 \pm 0,85\text{ng/mL}$.

Uma possível explicação para esta observação refere-se ao protocolo de indução da ovulação, utilizado no referido experimento. Deve-se considerar que os estudos que verificaram o efeito do hCG no incremento das concentrações plasmáticas de P_4 , não utilizaram previamente a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). No protocolo utilizado, foram administrados 300UI de eCG no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P_4 . Sugere-se que a aplicação de eCG no momento da retirada do dispositivo poderia favorecer o crescimento folicular, induzindo a ovulação de um folículo dominante maior, que propiciaria a formação de um CL, capaz de sintetizar quantidades adicionais de P_4 . De fato, no presente estudo, observou-se no D16 uma alta concentração plasmática de P_4 nos animais do grupo controle, que receberam exclusivamente o eCG como agente luteotrófico. No grupo controle, a média e erro padrão das concentrações plasmáticas de P_4 foram de $8,66 \pm 0,72\text{ng/mL}$. Marques et al. (2002) verificou que a administração de eCG não promoveu a ovulação de folículos maiores, mas que sua ação luteotrófica foi exercida sobre o CL formado, aumentando a área do CL e a quantidade de P_4 secretada pelo mesmo. Possivelmente, a eCG utilizada no protocolo de indução da ovulação tenha promovido aumento nas concentrações séricas de P_4 em todos os grupos de tratamento. Desta forma, não teria havido um efeito aditivo da hCG em complemento ao eCG administrado nove dias antes.

A partir das observações do presente estudo, sugere-se que a formação de um CL acessório possivelmente não garantiu o aumento nas concentrações séricas de P_4 em animais tratados previamente com eCG. Contudo, um aumento consistente nas concentrações séricas de P_4 no D16 ocorreu nas fêmeas que receberam hCG no D7 e se tornaram prenhes.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo conclui-se que vacas tratadas com a hCG, associada ou não ao FM e/ou bST, apresentam menor mortalidade embrionária entre o 15º ao 19º dia de gestação e maiores taxas de concepção aos 40 dias de gestação. Em fêmeas tratadas com a hCG, as concentrações plasmáticas de P_4 16 dias após IATF são maiores em fêmeas prenhes do que para as não prenhes. A aplicação de 500mg de bST não aumentou as concentrações séricas de P_4 no D7 e D16 e não promoveu aumento na taxa de concepção aos 40 dias de gestação. Na dose única de 2,2 mg/Kg PV, a administração da FM no D16 em vacas Nelore no período pós-parto não aumentou a taxa de concepção aos 40 dias de gestação nem as concentrações séricas de P_4 entre o D7 e o D16.

REFERÊNCIAS

ANUALPEC 2009: anuário da pecuária brasileira / Instituto FNP - São Paulo: FNP, 2009. 360 p.

AKÉ-LÓPEZ, R.; SEGURA-CORREA, J.C.; QUINTAL-FRANCO, J. Effect of flunixin meglumine on the corpus luteum and possible prevention of embryonic loss in Pelibuey ewes. **Small Ruminant Research**, v. 59, p. 83–87, 2005.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. F.; MARQUES, M. O. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo em Bos indicus. **Taurus**, n.12, p. 15 – 25, 2001.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. F.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 218 – 221 2002.

BELL, A.; RODRÍGUEZ, O.A.; CASTRO E PAULA, L.A.; PADUA, M.B.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; GUTIÉRREZ, C.G.; DE VRIES, A.; HANSEN, P.J. Pregnancy success of lactating Holstein cows after a single administration of a sustained-release formulation of recombinant bovine somatotropin. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 22, 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/22>>. Acesso em: 24 jul. 2009.

BELTRAN, M.P.; VASCONCELOS, J.L.M.; SANTOS, R.M.; DEMETRIO, D.G.B.; BARROS, C.M.; WECHSLER, F.S. Efeito do tratamento com GnRH ou hCG no dia 5 após a IA nas taxas de concepção em vacas Holandesas lactantes durante o verão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 440-442, 2003.

BENNETT, W.A.; GONZALEZ, L.V.; STUART, M.J.; FUQUAY, J.W. Effects of human Corionic Gonadotrophin pretreatment on endocrine, cytological and Prostaglandin F2 α receptor patterns of the bovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 179-189, 1989.

BERGAMASCHI, M.A.C.M. **Estratégias hormonais para otimizar a função luteínica das vacas da raça Nelore após a sincronização do estro**. 2005. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

BILBY, T.R.; GUZELOGLU, A.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, S.M.; MICHEL, F.; HEAD, H.H.; THATCHER, W.W. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3256–3267, 2004.

BILBY, T.R.; SOZZI, A.; LOPEZ, M.M.; SILVESTRE, F.T.; EALY, A.D.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus and growth hormone–insulin-like growth factor system response. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3360–3374, 2006.

BILBY, C.R.; BADER, J.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; MURPHY, C.N.; GARVERICK, H.A.; CROOKER, B.A.; LUCY, M.C. Plasma GH, IGF-1, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, v. 1, p. 1285-1296, 1999.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, 2000b. p. 99 -114.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 52, p. 1451-1463, 2001.

BLEVINS, C.A.; SHIRLEY, J.E.; STEVENSON, J.S. Milking frequency, estradiol cypionate, and somatotropin influence lactation and reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4176-4187, 2006.

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

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.B.; CARVALHO, G.R.; BORGES, J.C. Concentração plasmática de progesterona e metabólitos lipídicos em novilhas mestiças tratadas ou não com hormônio de crescimento e superovuladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1689-1696, 2001.

BREUEL, K.F.; SPITZER, J.C.; HENRICKS, D.M. Systemic progesterone concentration following hCG administration at various times during the estrous cycle in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 1564-1572, 1989.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.O.; KENNY, D.A.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 368-375, 2008.

CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. **Theriogenology**, v. 64, p. 49-60, 2005.

COHICK, W.S. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1769-1777, 1998.

CUSHMANN, R.A.; DE SOUZA, J.C.; HELGPETH, V.S. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 1533- 1547, 2001.

DEMETRIO, C.G.B. Modelos lineares generalizados. 46ª Reunião anual da RBBRAS, Piracicaba 2001; 113p.

DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 297-311, 2006.

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

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

FONSECA, J.F. **Corpo lúteo acessório, perfil plasmático de progesterona e taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos tratadas com diferentes hormônios**. 1999. 93f. (Dissertação de mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

FOXCROFT, G.; ALMEIDA, F.; AHERNE, F. Management of the gilt and first parity sow. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7., 2000. Foz do Iguaçu. **Anais...**, Foz do Iguaçu : ABRAVES, 2000. p.131-145.

FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H.; EDQVIST, L.E. 11-Ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator for measuring prostaglandin release during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the goat. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p.537-545, 1984.

FUNSTON, R.N.; LIPSEY, R.J.; GEARY, T.W.; ROBERTS, A.J. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1403-1405, 2005.

GALLO, G.F.; BLOCK, E. Effects of recombinant bovine on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 343-353, 1991.

GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; BIGGERS, B.G.; GARRET, J.E.; WETTEMANN, R.P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, p. 11-25, 1988.

GOISSIS, M.D.; BRESSAN, F.F.; ALMEIDA, A.B.; BERTAN, C.M.; BINELLI, M. Influence of an accessory corpus luteum (CL) on estradiol 17- β (E2)-induced prostaglandin F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) release in cattle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p.125 (resumo).

GUILBAULT, L.A.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; HAIBEL, G.K. Influence of a physiological infusion of prostaglandin F $_{2\alpha}$ into postpartum cows with partially suppressed endogenous production of prostaglandins: 1. Uterine and ovarian morphological responses. **Theriogenology**, v. 27, p. 931-946, 1987.

GUZELOGLU, A.; ERDEM, H.; SARIBAY, M.K.; THATCHER, W.W.; TEKELI, T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. **Veterinary Record**, v. 160, p. 404-406, 2007.

HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **Journal of Animal Science**, v. 80 (E. Suppl. 2), E33–E44, 2002.

HASLER, J.F.; BILBY, C.R.; COLLIER, R.J.; DENHAN, M.C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1919-1928, 2003.

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

KASTELIC, J.P.; AMBROSE, J.D. Effects of modified OvSynch protocols, including presynchronization, and/or post-breeding pLH or hCG, on pregnancy rates in dairy cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004., p. 334, (resumo).

LAMMING, G.E.; DARWASH, A.O.; BLACK, H.L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 245-252, 1989.

LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.; SOMERVILLE, S. **Condition scoring beef cattle**. Edinburgh: The East of Scotland College of Agriculture Bulletin, 1976. n.6, p. 8

LUCY, M.C.; CURRAN, T.L.; COLLIER, R.J.; COLE, W.J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. **Theriogenology**, v. 41, p. 561-572, 1994.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BARBOSA, R.T.; MADUREIRA, E.H.; FANTINI, D.; BINELLI, M. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

REPRODUCTION, 15., 2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 118.

MACHADO, R.; BARBOSA, R.T.; BARBOSA da SILVA, J.C.; BERGAMASCHI, M.A.C.M.; BERTAN, C.M.; SARTI, L.L.; BINELLI, M. A redução da mortalidade embrionária -estratégia hormonal para otimizar a função luteínica em bovinos. Circular Técnica- EMBRAPA- São Carlos-SP, 2006.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanisms in the cow. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory estradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p.171-180, 2000.

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

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

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 263–323, 1999.

MENEGHETTI, M.; LOSI, T. C.; MARTINS JUNIOR, A. P.; VILELA, E. R.; VASCONCELOS, J. L. M. Uso de protocolo de IATF associado a diagnóstico precoce de gestação e resincronização como estratégia para maximizar o

número de vacas gestantes por IA em estação de monta reduzida. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 147, p. 25 - 27, 2005.

MERRILL, M. L.; ANSOTEGUI, R.P.; BURNS, P. D.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1547-1554, 2007.

MERRILL, M.L.; ANSOTEGUI, R.P.; WAMSLEY, N.E.; BURNS, P.D.; GEARY, T.W. Effects of flunixin meglumine on embryonic loss in stressed beef cows. In: WESTERN SECTION OF ANIMAL SCIENCE, 2003, Miles City. **Proceedings...** Miles City: American Society of Animal Science, 2003. v. 54, p. 53-55.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, p.1371-1387, 2002a.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895-907, 2002b

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W.W. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1646-1656, 2001.

MOREIRA, F.; RISCO, C.A.; PIRES, M.F.; AMBROSE, J.D.; DROST, M.; THATCHER, W.W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1234-1247, 2000.

NAGANO, A.Y.; WEISS, R.R.; BUCHELE, J.M. A somatotropina bovina recombinante (rbST) na superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, p. 101-106, 2004.

NISHIGAI, M.; KAMOMAE, H.; TANAKA, T.; KANEDA, Y. Improvement in pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v. 58, p.1597-1606, 2002.

NISWENDER, G.D.; JUENDEL, J.L.; SILVA, P.J. Mechanisms controlling the function and lifespan of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p. 1-29, 2000.

ODENSVIK, K.H. Pharmacokinetics of flunixin and its effect on prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations after oral and intravenous administration in heifers. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic**, v. 18, p. 254-259, 1995.

ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, p. 35-44, 1998.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético das raças zebus. In:____. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999. p.198-251.

PUGH, M.L.; MOREIRA, M.B.; GILBERT, G.R.; YOUNGS, C.R. Influence of prostaglandin F_{2α} synthesis inhibitors on pregnancy rate of embryo transfer recipient heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 399. (resumo).

PURCELL, S.H.; BEAL, W.E.; GRAY, K.R. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Theriogenology**, v. 64, p. 867–878, 2005.

ROBERTS, R.M.; LEAMAN, D.W.; CROSS, J.C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Proceedings Soc Exp Biol Med**, v. 200, p. 7-18, 1992.

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

SANTOS, J.E.P.; TATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVAO, K.N. The effect embryonic death rates in cattle on the efficacy os estrous synchronization progrms. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p. 513-535, 2004a.

SANTOS, J.E.P.; JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; TATCHER, W.W.; DEI, C.S.; BILBY, C.R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 868-881, 2004.

SAS. SAS Institute. Cary, NC, USA: SAS, 2004.

SCENNA, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; ROHRBACH, N.R.; WEHRMAN, M.E.; SCHRICK, F.N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 78, p. 38-45, 2005.

SCHMITT, E.J.P.; DIAZ, T.; BARROS, C.M.; DE LA SOTA, R.L.;DROST, M.; FREDERICKSSON, E.W.; STAPLES, C.R.;THORNER, R.; THATCHER, W.W.

Diferencial response of the lutealphase and fertility in cattle following ovulation of the first wave follicle with hCG or an agonist of GnRH. **Journal of Animal Science**, v. 74, p.1074-1083, 1996b.

SIANANGAMA, P.C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy rates in cows. **Theriogenology**, v.38, p.85-96, 1992.

STARBUCK, G.R.; DARWASH, A.O.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. In: DISKIN, M.G., fertility in the High Producing Dairy Cow. **BSAS Occasional Publication**, v.26, p.313-322, 2001.

STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; INSKEEP, E.K. Maintenance of Pregnancy in Dairy Cattle After Treatment with Human Chorionic Gonadotropin or Gonadotropin-Releasing Hormone. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.3092–3101, 2008.

STEVENSON, J.S.; PORTALUPPI, M.A.; TENHOUSE, D.E.; LLOYD, A.; EBORN, D.R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J.M. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.1, p.331-40, 2007.

STRONGE, A.J.H.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p. 1212-1224, 2005.

THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Systems to alter embryo survival. Large dairy herd management. **American Dairy Sciences Association**, p. 16-30, 1992.

THATCHER, W.W.; BILBY, T.R.; BARTOLOME, J.A. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, p. 30-44, 2006.

THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2 alpha and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v.31, p. 745-759, 1986.

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.

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

VELDHUIS, J.D.E.; NESTLER, J.E.; STRAUSS, J.F. Insulin regulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cell. **Endocrinology**, v.118, p. 242-248, 1986.

WATHES, D.C.; REYNOLDS, T.S. ; ROBINSON, R.S.; STEVENSON, K.R. Role of insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 1778-1789, 1998.

WATHES, D.C.; TAYLOR, V.J.; CHENG, Z.; MANN, G.E. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. **Reproduction**, v.61 (Supplement), p.219-237, 2003.