THIAGO SANTIN

Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular

Pirassununga

2013

Thiago Santin

Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: Testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 30/10/2013 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

VRA

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2886
FMVZ

Santin, Thiago
Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: testes *in vitro, in vivo* e de dinâmica folicular. / Thiago Santin. -- 2013.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. IATF. 2. Vacas de corte. 3. Dispositivo de P4. 4. Monodose. 5. 3 Usos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego de dispositivos vaginais de uso único (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: Testes *in vivo* e de dinâmica folicular", protocolado sob o nº 2996/2013, utilizando 28 (vinte e oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Use of single dose implants or three-use vaginal devices for progesterone sustained release in beef cows: *in vivo* and follicular dynamics tests", protocol number 2996/2013, utilizing 28 (twenty eight) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 27 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTIN, Thiago

Título: Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos,

A Gisele Mouro,

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Neuza, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões, devo esse título a você. Obrigado por tudooo!!!!

Ao meu pai José Francisco, quantas saudades... sei que você olha por mim.

Aos meus irmãos queridos, Dú e Grá, obrigado pelo estímulo e por acreditarem em meus projetos, vocês são a minha base e inspiração.

A Gi, você é responsável por essa conquista, meu amor!

Ao Professor Ed Hoffmann Madureira, por me ensinar a olhar o mundo de outra forma. Obrigado, pelos conselhos, conversas e pelas orientações no mestrado e para a vida.

Aos meus cunhados e sobrinhos que eu adoro tanto.

Aos adoráveis tio Bruno e tia Maria. Foi no rancho na beira do rio nos finais de semana que aprendi amar e respeitar a natureza.

Ao tio Joel, pelos ensinamentos durantes as minhas férias na saudosa fazenda São José, foi lá que descobri o que realmente amo fazer.

Ao tio Isaias, pelos direcionamentos, incentivo à carreira acadêmica e auxílio nos primeiros projetos. Nossos almoços de domingo são sempre muito especiais. Nunca me esquecerei das 15 ovelhas que você comprou!

Ao tio e padrinho Israel, pelos conselhos, auxílios nas horas difíceis, conversas e amizade. Gosto muito de conversar com você! Por isso que sempre te ligo. Obrigado por me auxiliar no começo da carreira, sinto uma saudade enorme do Haras da Prata e da chácara.

Ao meu tio Valdir, tias, Fátima, Roselena, Roseles e Fernanda. Sei que vocês torcem muito por mim

A todos meus primos e primas pela amizade desde a infância.

Aos Professores Rubens Paes de Arruda, Mario Binelli, Annelise Traldi (Kiky), André Furugen Cesar de Andrade e Carla Eneiva.

A Biogénesis-Bagó, em especial Lucas Souto, pelo material cedido e ajuda nos experimentos.

Ao Henrique, pela amizade e risadas.

Ao Kleber pela amizade e auxílio nas dificuldades, principalmente estatísticas.

Ao Milton, pelo companheirismo desde a época da UNIFEOB, faz sete anos que trabalhamos juntos... Você vai ter que me aguentar muito ainda!

Ao pessoal da velha guarda de Pira, Jú Mega (tenha dóooo) e Jú Diniz (meus bezerros estão tão lindos!).

Às minhas companheiras de casa de VRA, Moana (leite quente), Dani (Aroooooozzzz!), Shirley (fala direito comigo!), Milena (oxiii) e Roney (Gaúcho). Não sei como morávamos em nove naquela casa! rs

Aos “Hoffmanns” antigos, Patrícia, Zé Rodrigo e a querida Aline, você sempre quebra meus galhos rsrsr.

Aos amigos da pós Doce, Bruna, Tici, Bati, Estela, Saara, Everton, Ângela, Tatujo, Guilherme, Fernando, Maris e Guapa.

Aos estagiários que aguentaram meu mau humor matinal e fizeram parte dessa conquista. Carol, Rodrigão (Rondônia), Aline (vermeia), Juan Kamilo (meu filho Colombiano), Toninho e Vivi.

A Portuguesa mais louca que o Brasil Já conheceu, Valeu Qui!

Aos amigos da UNIFEOB, Paulo, Dino, Mary, Karem, Débora, Macarrão, Touro, Xuxa e Maguinho.

Aos funcionários, Clayton, Harumi, Zé Maria, João e Márcio. Aos funcionários do gado de leite, gado de corte, ovinoculura e suinocultura.

A bibliotecária Neusa Kazue Habe, por toda ajuda com a dissertação!

Ao Jimmy, Janes, Cindy e Hanna, pelo fiel companheirismo desde os tempos de faculdade. Meus dias são mais felizes com vocês.

A todos os animais utilizados nos experimentos, a eles devo todo meu respeito e consideração.

A equipe da higilimp, pelos cafés e conversas matinais.

Ao Prof. Doutor Eduardo H. Birgel Júnior, Daniela e aos pós Graduandos, Mel, Flávio, Vanessa e Paulinho.

Peço desculpa, pois com certeza esqueci várias pessoas importantes.

Muito Obrigado!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein.

RESUMO

SANTIN, T. **Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte:** testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular**.** [Use of single-use vaginal devices (single dose) or three uses for sustained release of progesterone in beef cows: in vitro tests, in vivo and follicular dynamics]. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de dois dispositivos intravaginais de progesterona (P4) comerciais constituídos de matriz de silicone, um contendo um grama (g) de progesterona (Cronipres® de 3usos, Biogénesis Bagó, Argentina) e outro contendo 0,558 g de P4 (Cronipres® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Argentina). O presente estudo foi dividido em três experimentos: O primeiro comparou a cinética de liberação de P4 (*Teste in vitro*). O segundo, avaliou as concentrações plasmáticas de P4 em vacas ovariectomizadas (*Teste in vivo*). No terceiro, vacas multíparas ciclícas passaram por um protocolo de sincronização da ovulação para IATF, onde foi avaliada a dinâmica folicular, desde a colocação do implante no D0, até o momento da inseminação (Dinâmica folicular). Nesse experimento as concentrações séricas de P4 foram dosadas nos dias 6, 7 e 8 do protocolo de IATF. No experimento *In vitro* supracitado, os dois dispositivos, foram alocados em duplicata, no dissolutor de comprimidos, o qual continha álcool e água na proporção de 60:40. Amostras foram colhidas nos seguintes momentos: 2min, 24, 48, 72, e 96 horas. As quantidades de P4 foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Para quantidade acumulada de P4, segundo dispositivo, em função do tempo, houve interação tempo*tratamento (P=0,0002). A quantidade de P4 diferiu entre os dois dispositivos testados e também em relação ao tempo (P<0.0001). Houve diferença estatísitica, nos tempos 2min, 72 e 96 horas. As equações que descrevem as quantidades liberadas são: dispositivos Cronipres® 3 usos Y= 62,396x + 175,70 (R^2 = 0,99) Cronipres® Mono Dose Y= 53,314x + 127,7(R^2=0,98). No experimento *in vivo*, 8 vacas ovariectomizadas foram divididas em dois grupos, metade recebeu o Cronipres® de 3 usos e a outra metade recebeu o Cronipres® Mono Dose durante 11 os dias de tratamento. Foram colhidas amostras nos tempos 0 (colocação do dispositivo), 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 144, 192,

216, 240 e 264 horas. Foram comparados os teores plasmáticos de P_4, por espectrometria de massas no laboratório Thomson da Universidade de Campinas (UNICAMP). Houve efeito de tratamento e de tempo ($p < 0,05$), entretanto, não houve efeito de tempo ($p > 0,05$). No terceiro experimento, 20 vacas multíparas cíclicas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação. Os animais receberam 2 mg intramuscular (IM) de Benzoato de Estradiol . Metade do grupo (n=10) recebeu um dispositivo intravaginal de P4, Cronipres® 3 usos, e a outra metade (n=10) recebeu o Cronipres® Mono Dose M-24. No D8 procedeu-se a retirada do implante e aplicação IM de 150 µg de D-cloprostenol . No D9, todos os animais receberam 1mg IM de Benzoato de estradiol . Foi realizado o escaneamento dos ovários por ultrassonografia a cada 24 horas, do momento da inserção do dispositivo até à retirada no D8. A partir da indução, todas as vacas tiveram seus ovários escaneados e mapeados a cada 12 horas, durante 4 dias. Coletas de sangue foram efetuadas nos dias seis, sete e oito do protocolo para comparar as concentrações plasmáticas de P4 antes da retirada do dispositivo. Foram avaliadas as variáveis, início da nova onda de crescimento folicular, diâmetro do folículo pré-ovulatório (de forma retrospectiva) e momento da ovulação pelo teste qui quadrado. Os dados de ovulação, foram submetidos à análise de regressão logística, pelo PROC MIXED e os dados de desenvolvimento folicular, pelo PROC LOGISTIC (SAS, versão 9.3). Não houve diferença no início da nova onda de crescimento folicular, diâmetro do folículo pré-ovulatório e taxa de ovulação ($P>0,05$). Houve uma tendência de antecipação da ovulação ($P=0.06$), das vacas do grupo cronipres Mono Dose, uma vaca desse grupo antecipou a ovulação em cerca de 36 h.Mesmo apressentando diferenças estatísticas nos testes *in vítro e in vivo,* os animais tratados com dispositivo de 0,558 gramas apresentaram padrão de desenvolvimento folicular semelhante ao grupo tratado com o dispositivo de 1g.

Palavras-chave: IATF. Vacas de corte. Dispositivo de P4. Monodose. 3 usos.

ABSTRACT

SANTIN, T. **Use of single-use vaginal devices (single dose) or three uses for sustained release of progesterone in beef cows:** in vitro tests, in vivo and follicular dynamics**.** [Emprego de dispositivos vaginais de único uso (monodose) ou de três usos para liberação sustentada de progesterona em vacas de corte: testes *in vitro*, *in vivo* e de dinâmica folicular]. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

This study aimed to compare the efficiency of two commercial intravaginal progesterone (P4) devices consisting of silicone matrix, containing 1 gram (g) of progesterone (Cronipres of 3uses ®, Biogenesis Bagó, Argentina) and another containing 0.558 g P4 (Cronipres ® Mono Dose M-24, Biogenesis Bagó, Argentina). This study was divided into three experiments: The first compared the kinetics of release of P4 (in vitro test). The second evaluated the plasma concentrations of P4 in ovariectomized cows (in vivo test). In the third, multiparous cyclical cows passed a complete protocol where TAI was evaluated follicular dynamics, since the placement of the implant in D0, until the time of insemination (follicular dynamics) and serum concentrations of P4 before removing devices (follicular dynamics). In vitro experiment above, the two devices were placed in triplicate in dissolver of tablets, which contained alcohol and water in the ratio of 60:40. Samples were collected at the following times: 2min, 24, 48, 72, and 96 hours. The amounts of P4 were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To cumulative amount of P4, the second device as a function of time, treatment time * significant interaction (P = 0.0002). The amount of P4 differed between the two implants Cronipres ® and also in relation to time (P <0.0001). There were differences in the times 1, 4, 5. The equations that describe the quantities released are Cronipres device 3 uses ® Y - = 175.70 + 62.396 x (R2 = 0.99) Cronipres Dose ® Mono Y = 53.314 x + 127.7 (R2 = 0.98). In the in vivo experiment, 8 ovariectomized cows were divided into two groups, half received Cronipres ® 3 uses the other half received the Cronipres ® Mono Dose for 11 treatment days. Samples were collected at 0 (implant placement), 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 216, 240, 264 hours. We compared the plasma levels of P4, mass spectrometry laboratory Thomson of the University of Campinas (UNICAMP). No effect was observed treatment and animal (p> 0.05) however there was only time effect (p <0.05). In the third experiment, 20 multiparous

cows and cyclic undergone a complete protocol for fixed-time artificial insemination (TAI). In D0 treatment, all animals received 2 mg intramuscular (IM) of estradiol benzoate (Cronibest ® - Biogenesis-Tobago, Argentina). Half of the group (n = 10) received an intravaginal P4 device, Cronipres ® 3 uses, and the other half (n = 10) received the Cronipres ® Mono Dose M-24. In D8 proceeded to implant removal and application of IM 150 mg of D-cloprostenol (Croniben ®, Biogenesis-Bagó, Argentina). On Day 9, all animals received 1 mg IM. of estradiol benzoate (Cronibest ® Biogenesis-Bagó, Argentina). Was performed by ultrasound scanning of the ovaries every 24 hours from time of insertion of the implant to the withdrawal D8. From induction, all cows had their ovaries scanned and mapped every 12 hours for 4 days. Blood samples were taken on days six, seven and eight protocol to compare the plasma concentrations of P4 before removing the device. The variables, early new wave of follicular growth, diameter of the preovulatory follicle (retrospectively), ovulation rate and time of ovulation. Ovulation data were analyzed by logistic regression using PROC LOGISTIC and follicular development data, using PROC MIXED (SAS, version 9.3). The ovulation rate was 80% for both groups (P> 0.05). There was a tendency to anticipate ovulation (P = 0:07), cows in group B. A cow's ovulation group B anticipated for about 36 h. There was no difference in estatístisca dominant follicle diameter at the time of TAI, on the emergence of a new wave and pre ovulatory follicle size (p> 0.05).

Keywords: AIFT. Beef cows. P4 device. Single dose. 3 uses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interação de tempo, tratamento e animal..... 50

Tabela 2 - Dados de dinâmica folicular em vacas multíparas cíclicas tratadas com diferentes dispostivos intravaginais constituídos de silicone..... 57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Liberação de P4 acumulada no tempo 1 (2 minutos)..... 43

Gráfico 2 - Liberação de P4 acumulada no tempo 2 (24 horas)..... 43

Gráfico 3 - Liberação de P4 acumulada no tempo 3 (48 horas)..... 44

Gráfico 4 - Liberação de P4 acumulada no tempo 4 (72 horas)..... 44

Gráfico 5 - Liberação de P4 acumulada no tempo 5 (96 horas)..... 45

Gráfico 6 - Quantidade acumulada de P4 (ng/mL) em função da raiz quadrada do tempo..... 45

Gráfico 7 - Liberação diária de P4 Cronipres® Mono Dose e 3 Usos..... 46

Gráfico 8 - Liberação de P4 acumulada por cm em função da raiz quadrada do tempo (µg/cm2/$t^{1/2}$)..... 46

Gráfico 9 - Teores plasmáticos de P4 (ng/mL) em função do tempo..... 51

Gráfico 10 - Concentração Sérica de P4 (ng/ mL) nos dias 6, 7 e 8..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BE	Benzoato de Estradiol
BST	Somatotropina Bovina
CL	Corpo Lúteo
cm^2	Centímetro quadrado
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP	Cipionato de Estradiol
E2	Estrógeno
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	grama
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg	kilograma
LH	Hormônio Luteinizante
IM	Intramuscular
mg	miligrama
mL	mililitros
mm	milimetros
ng	nanograma
PGF	Prostaglandina
PGF2α	Prostaglandina F2 α

P4	Progesterona
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
VE	Valerato de Estradiol
µg	microgramа
µg	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR 24
2.2 PROGESTERONA 26
2.2.1 Teores plasmáticos durante o ciclo estral 26
2.2.2 A importância da P4 na qualidade embrionária 27
2.2.3 Liberação de P4 por matrizes poliméricas 28
2.2.4 Receptores de P4 e de E2 29
2.2.5 Farmacocinética 30
2.2.6 Progesterona/Progestágenos 32
2.3 ESTRADIOL 33
2.4 ECG 35
2.5 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO NOS PROTOCOLOS DE IATF 36
2.6 PROSTAGLANDINA 37
3. HIPÓTESES 39
3.1 EXPERIMENTO *IN VITRO* 39
3.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS OVARIECTOMIZADAS 39
3.3 DINÂMICA FOLICULAR 39
4 OBJETIVO GERAL 40
4.1 EXPERIMENTO *IN VITRO* 40
4.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS OVARIECTOMIZADAS 40
4.3 DINÂMICA FOLICULAR 40
4.3.1 Objetivos específicos 40
5 MATERIAIS E MÉTODOS 41
5.1 EXPERIMENTO *IN VITRO* 41
5.1.1 Local 41
5.1.2 Delineamento experimental 41
5.1.3 Análise Estatística 42
5.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* 43
5.2.1 Local 43
5.2.2 Delineamento experimental 43
5.2.3 Análise estatística 44
5.3 DINÂMICA FOLICULAR 44
5.3.1 Animais e local do experimento 44
5.3.2 Manejo reprodutivo e tratamento 45
5.3.3 Exames ultrassonográficos 46

5.3.4 Coleta de sangue e análise de progesterona 46
5.3.5 Análise Estatística 47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
6.1 EXPERIMENTO *IN VITRO* 47
6.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* 52
6.3 DINÂMICA FOLICULAR 54
7 CONCLUSÃO 56
REFERÊNCIAS 57

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país em que, o agronegócio apresenta fundamental importância para o desenvolvimento econômico, tecnológico e social. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2012), de 2008 a 2012, o rebanho bovino brasileiro aumentou cerca de 6,5%. O rebanho nacional passou de 199,75 milhões de cabeças para 212,85 milhões de cabeças. Desde 2008, o aumento do rebanho foi contínuo. Embora tenha se tornado um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, a pecuária brasileira precisa passar por adequações Estima-se que, em 2002 foram realizadas 100 mil IATFs no Brasil, em 2009 este número saltou para 3,2 milhões de procedimentos (INÁCIO, 2010) e para 5 milhões em 2010 (MORGAN, 2011). . Segundo a Asbia (2012), de 2008 a 2011 a venda de sêmen cresceu cerca de 23,5%. Foram vendidas, em 2011, 11.906.763 doses de sêmen, 7.011.641doses provenientes de touros de corte e o restante, proveniente de touros de leite. Atualmente, mais de 50% do sêmen comercializado no Brasil está sendo utilizado na IATF (BARUSELLI, 2012).

O aumento da produção de leite e carne aliada à alta eficiência reprodutiva são fatores fundamentais para aumentar a lucratividade da atividade pecuária (VASCONCELOS; MENEGHETTI, 2006). Nesse panorama, as estratégias de manejo reprodutivo contribuem para aumento da rentabilidade destes sistemas de produção. A inseminação artificial (IA) e a IATF são biotécnicas que proporcionam a introdução de genética superior, pela utilização de touros melhoradores. Mesmo havendo um grande progresso na porcentagem de animais inseminados, o emprego dessas biotecnologias é pouco expressivo nas criações de corte e leite, atingindo aproximadamente 10% do rebanho nacional (ASBIA, 2012)

Dentre os principais entraves para a implementação de programas de IA, em fazendas de corte, como em fazendas de leite está a dificuldade na observação e reconhecimento do cio (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005; BÓ et al., 2007). Além disso, existem problemas, como estro de curta duração (MIZUTA, 2003), com elevada porcentagem de manifestação noturna (GALINA et al., 1996; PINHEIRO et al., 1998;). e alta incidência de anestro pós-parto em vacas zebuínas (LUCY et al.,

2001; GASSER et al.; 2003; BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA et al., 2006; BÓ et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009).

O entendimento da fisiologia do ciclo estral bovino, possibilitou a melhora da eficiência reprodutiva das fêmeas, pelo uso de fármacos foi possível modificar o ciclo estral, interferindo na sequência cronológica natural, das ondas de crescimento folicular dentro de um ciclo, também por alterações nas fases dentro de cada onda de crescimento folicular, possibilitando assim, pelo uso da IATF, a elevação da taxa de serviço para 100%, visto que todos os animais disponíveis são inseminados no mesmo dia (MADUREIRA et al., 2004). Os Programas de IATF também permitem a implementação da IA em um grande número de vacas em um mesmo dia, manutenção de baixo intervalo entre partos (produção de um bezerro por ano), concentração dos partos, antecipação das prenhezes na temporada de monta, planejamento do período de nascimento dos bezerros em épocas de melhor oferta de pastagem, resultando em bezerros mais pesados ao desmame, redução do número de touros, quando utilizada a ressincronização e formação lotes de bezerros desmamados homogêneos para a comercialização e confinamento em rebanhos de corte (BARTOLOMEU et al., 2003; GONÇALVES et al., 2004). Sá Filho (2013) observou que, durante a estação de monta, grupos de fêmeas zebuínas lactantes submetidas a um protocolo de IATF + touro e IATF + detecção de estro + touro apresentaram maior número de prenhezes no início da estação (45 dias) e um número maior de vacas prenhes quando comparadas com 2 grupos de vacas que foram submetidas à detecção de estro + monta natural e somente monta natural.

Os dispositivos intravaginais de liberação sustentada de progesterona (P4) têm um papel fundamental nos protocolos de IATF, pois quando associados a outros hormônios, sincronizam a ovulação, possibilitando a taxa de serviço de 100% das matrizes, induzem a ciclicidade de vacas em anestro, acarretando incremento na taxa de prenhez. No Brasil, a reutilização dos dispositivos comerciais é uma prática muito comum, visando a melhoria da relação do custo/benefício dos protocolos de IATF (BARUFI et al., 2002; MOTLOMELO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006), nesse cenário, os dispositivos de três usos são uma alternativa interessante para a redução dos custos dos protocolos (ALMEIDA et al., 2006), porém, quando reutilizados, em alguns casos, a concentração reduzida de P4 desses dispositivos

pode não oferecer quantidades suficientes deste hormônio para sincronizar adequadamente todas as categorias (vacas paridas) dentro do rebanho, aumentando o risco de alcançar taxas de concepção variadas, prejudicando a eficiência reprodutiva.

Os dispostitivos de P4 podem também oferecer risco de contaminação aos funcionários, devido à necessidade de higienização dos mesmos após o primeiro uso, pois estes, nem sempre estão treinados para fazer a higiene correta e de forma segura desses produtos. O armazenamento dos dispositivos após a higienização, nem sempre é feito em embalagens que garantam proteção ao produto, nem a quem irá manipulá-lo. Além disso, segundo Junqueira e Alfieri (2006), dispositivos intravaginais reutilizados, podem transmitir doenças como IBR E BVD. Portanto, pensando em eficiência de manejo, logística e biossegurança, existe uma tendência na indústria farmacêutica ao desenvolvimento e uso de produtos de uso único.

O presente trabalho, tem como objetivo comprar a eficiência do primeiro uso de um dispositivo contendo 1 grama de P4, Cronipres® 3 usos (Biogénesis Bagó, Argentina) e outro dipositivo contendo 0,558 grama de P4, Cronipres® Mono Dose (Biogénesis Bagó, Argentina). Para elucidar as possíveis diferenças, foram realizados 3 estudos. Primeiramente foi realizado o estudo *in vitro,* com o objetivo de conhecer as quantidades liberadas em cada implante e caracterizar a cinética de liberação de P4. Posteriormente, foi desenvolvido um estudo *in vivo,* para comparar os teores plasmáticos atingidos em vacas ovariectomizadas. Por fim, um experimento com vacas cíclicas, para verificar possíveis diferenças no desenvolvimento folicular e nos teores plasmáticos de P4 nos 3 últimos dias de tratamento de um protocolo de IATF (dias 6, 7 e 8).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O ciclo estral é o período compreendido entre dois estros consecutivos, tendo duração de 17 a 25 dias (FORTUNE, 1994), com média de 21 dias (HAFEZ, 2004). Em bovinos, a duração média do estro é de aproximadamente 12 horas e a ovulação ocorre de 12 a 16 horas após o término do cio. A duração do cio e o momento de ovulação apresentam variações entre fêmeas da mesma espécie, em função de fatores endógenos e exógenos (LUCY et al.,1992).

O início da oogênese ocorre desde a fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelínico para a gônada em formação, originando as oogônias, que se diferenciam em oócitos, que vão originar os folículos primordiais (GUERRA, 2001). Após esse processo, ocorrem crescimento e maturação folicular, regulados por fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos (MAGALHÃES et al., 2009)

Com a utilização da ultrassonografia, foi possível observar que a grande maioria das fêmeas bovinas apresenta duas (PIERSON; GINTHER, 1988) ou três ondas foliculares por ciclo, sendo apenas a última onda ovulatória. (GINTHER et al., 1989). Cada onda folicular, apresenta 4 etapas distintas de desenvolvimento: recrutamento, seleção, dominância, atresia ou ovulação (BÓ et al., 2000). Figueiredo et al. (1997), observaram que não ocorre um padrão fixo no número de ondas folicular, ocorrendo variação em animais da mesma raça, e de um ciclo para outro no mesmo animal. O desenvolvimento de uma terceira onda é mais provável em animais que possuem fase luteínica mais longa. (GINTHER et al., 1989).

GONG et al.(1996) acreditam que o número de folículos que emergem numa onda de crescimento está diretamente relacionado aos níveis circulantes de IGF-1, e que vacas tratadas com hormônio do crescimento somatotropina (bST)] podem aumentar o número de folículos recrutados. Pontes et al. (2009) relataram pela técnica de

aspiração folicular recuperou uma média de 25 oócitos em vacas *Bos indicus*, uma quantidade 4 vezes maior do que a encontrada em *Bos taurus*, esse fato pode ser explicado pelos maiores níveis circulantes de IGF-1 encontrados em animais *Bos indicus* quando comparados a *Bos taurus* (ALVAREZ et al., 2000)

A primeira onda de crescimento folicular geralmente começa seu desenvolvimento ao mesmo tempo em que ocorre a ovulação (MARTINEZ et al., 2004), apresentando a liberação de um pico de FSH. Durante os próximos 3 dias que sucedem esse evento, ocorre o desenvolvimento semelhante de 10- 30 folículos, que estão na fase antral, com diâmetro de 3-4 mm (GINTHER.; KNOPF; KASTELIC,1989; BÓ, 2000; GINTHER et al., 2003). Após esse período, ocorre a seleção, na qual um ou dois folículos, começam a apresentar maior desenvolvimento e crescente produção de estradiol e inibina, enquanto seus subordinados entram em atresia (LUCY et al., 1992; BÓ et al., 2002). No folículo dominante, ocorre a multiplicação das camadas da granulosa e a organização das células da teca (SENEDA et al., 2008). Na ausência do Hormônio Luteinizante (LH), ou em baixas concentrações plasmáticas, o folículo dominante regride e surge uma nova onda de crescimento folicular (MAPLETOFT et al., 2008). Caso não exista um corpo lúteo responsivo, o estrógeno circulante aumentará a amplitude e a frequência dos pulsos de LH no folículo dominante ocorrendo a ovulação (LUCY, 2001; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O LH induz a ovulação por duas vias distintas. Adenociclase AMPc e fosfolipase fosfato (GILCHRIST et. al., 1996). O folículo pré ovulatório apresenta uma camada avascular de células da granulosa, envolvida por uma membrana basal. No momento da ovulação, essa membrana se rompe, liberando líquido folicular e oócito. O corpo hemorrágico e posteriormente o corpo lúteo será formado no local onde existia o folículo dominante (MILVAE et al., 1996). As células da granulosa e da teca darão origem a células luteínicas grandes e pequenas, que produzirão maior e menor produção de P4 respectivamente. Gradualmente, o CL aumenta de tamanho e, consequentemente, a secreção de P4 (NISWENDER et al**.,** 2000). Após atingir sua capacidade máxima de produção de P4, o mesmo ficará estabilizado até aproximadamente dia 16 e 17 do ciclo estral. Caso não ocorra fecundação e o reconhecimento materno fetal, haverá a regressão funcional e estrutural do CL

(RATHBONE et al., 2001). Nessa fase, pulsos de prostaglandina F2α (PGF) são liberados pelo endométrio uterino. (SHEMESH; HANSEL, 1975).

2.2 PROGESTERONA

2.2.1 Teores plasmáticos durante o ciclo estral

Os teores séricos de P4 também sofrem variação quanto à raça. Entre os dias 7 e 17 do ciclo estral foram encontrados, 4,1±0,5 ng/mL, em animais da raça Brahman e 5,3±0,3 em animais Angus (SEGERSON et al., 1984). Em vacas da raça Gir, nos dias 13 e 15 do ciclo, apresentaram resultados que variaram entre 4,91 a 6,70 ng/mL (MADUREIRA, 1988). Os teores plasmáticos de P4 encontrados antes do estro foram de 0,43±0,12 ng/mL, de 0,33±0,07 durante o estro e 0,20±0,06 dois dias após (WETTEMANN et al., 1972). Valores abaixo de 1ng/ml, foram sempre detectados durante o estro e nos 2 dias subsequentes (ERB et al1976), tanto para *Bos taurus,* quanto para *Bos indicus* (WETTEMANN et al., 1972).

Segundo Wiltbank et al. (2001), o fluxo sanguíneo hepático em vacas leiteras lactantes é duas vezes maior do que nas não lactantes, o que foi associado à maior metabolização hepática de estradiol e de P4, reduzindo a concentração sangüínea destes hormônios em 25% durante o ciclo estral. Sangsritavong et al. (2002) observaram que vacas lactantes apresentaram menores teores plasmáticos de E2 (265,44±4,99 *vs* 351,19±5,77 pg/mL) e P4 (2,43±0,17 *vs* 3,53±0,20 ng/mL) e maior fluxo sanguíneo hepático (1183±90,8 *vs* 757±104,8 litros/horas) quando comparadas com vacas não lactantes com peso semelhante.

Wiltbank et al. (2006), associaram a alta ingestão de matéria seca, e a alta produção leiteira, com o aumento na circulação hepática e, consequentemente, maior metabolização dos hormônios esteroides. Estes autores, concluíram que este pode ser um dos principais fatores que acarretam falhas reprodutivas, como a diminuição

ou ausência da expressão do comportamento estral (WILTBANK et al, 2004; LOPEZ et al., 2005) e aumento na taxa de dupla ovulação (LOPEZ et al., 2005), aumentando a incidência de partos gemelares (RYAN; BOLAND, 1991), maior porcentagem de perdas gestacionais (VASCONCELOS 1997; SANTOS et al., 2004) e, por fim, redução de fertilidade (LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002).

Resultados semelhantes foram relatados por Santos e Vasconcelos (2006) que observaram efeitos negativos do aumento do consumo de concentrado (2,0 kg e 8,0 kg) sobre os teores séricos de P4, durante o ciclo estral, de vacas não lactantes. No trabalho citado, houve interação entre a quantidade de concentrado fornecido, diâmetro do CL e P4 plasmática, sugerindo que as vacas do grupo que recebeu, 8,0 kg tinham menores concentrações séricas de P4, devido ao aumento do fluxo de sangue para o fígado.

2.2.2 A importância da P4 na qualidade embrionária

.O estabelecimento e manutenção da prenhez em ruminantes ocorrem após o reconhecimento materno da gestação. Em ruminantes, esse período requer o alongamento do embrião (ANTONIAZZI et al., 2011). A P4 tem papel importante na receptividade do ambiente uterino, altas concentrações de progesterona circulante imediatamente após a concepção têm sido associadas ao alongamento do concepto (SPENCER et al., 2001; SATTERFIELD et al*.,* 2006) juntamente ao aumento da produção de interferon-tau (MANN et al., 2001) e maiores taxas de prenhez em vacas (STARBUCK et al*.*, 1999; DISKIN & MORRIS, 2008; WILTBANK et al., 2011) e ovelhas (SATTERFIELD et al., 2006). Diversas linhas de pesquisa também evidenciam que esse hormônio auxilia na maturação do oócito, impactando a qualidade do mesmo (LONERGAN, 2011), porem experimentos *in vitro* apresentam resultados controversos. Aparicio et al. (2011) observaram que a inibição da P4 in vitro está associada ao baixo desenvolvimento embrionário, enquanto outros autores não chegaram às mesmas conclusões (REGGIO et al., 1997 GOLF; SMITH, 1998).

Dispositivos intravaginais de P4 foram utilizados após a IA na tentativa de aumentar as concentrações circulantes desse hormônio (BELTMAN et al*.,* 2009). Carter et al. (2008) implantaram o dispositivo de P4 no D3 e o retiraram no D8 o que resultou em um maior concepto no dia do abate (D16)

É evidente que a P4 tenha papel chave na manutenção da gestação, Ela afeta os pulsos de LH e a qualidade oocitária e embrionária. Sua ação no endométrio uterino também é um fator essencial para a formação de um ambiente uterino ideal em que o embrião pode se desenvolver. Suplementações de P4 após a IA têm levado a resultados variados nas taxas de prenhez. Estes resultados podem ser devido à categoria do animal tratado e/ ou às concentrações de P4 endógenas durante o ciclo estral. A identificação de animais com quantidades séricas de P4 abaixo do normal, leva a uma melhora na eficiência reprodutiva após a terapia (LONERGAN, 2011).

2.2.3 Liberação de P4 por matrizes poliméricas

Os polímeros sintéticos fazem parte de uma das classes de materiais mais versáteis que existem, apresentando aplicações inclusive no setor farmacêutico (LANGER; PEPPAS, 2003).

O coeficiente de difusão de uma substância na matriz é influenciado pelas características do silicone do implante (área e espessura), tipo de material, temperatura, concentração inicial e cura (DZIUK; COOK, 1966; PIMENTEL 2006).

Níveis plasmáticos acima de 1ng/ml, são encontrados em um curto prazo de tempo após a inserção do implante, devido a rápida absorção da P4 através da parede vaginal e distribuição no sistema circulatório (RATHABONE et al., 2002) Pimentel (2006) relatou um pico, 4 horas depois da inserção do dispostivo, com um gradual declínio até o final do experimento.

Bunt et al. (1997) adaptaram a técnica descrita na United States Pharmacopeia, originalmente descrita para avaliação de implantes humanos, para dosar a quantidade liberada *in vitro de P4 por* um implante de uso veterinário.

Diversos autores calcularam a quantidade de P4 liberada *in vitro*, em função da raiz quadrada do tempo. Essa equação, conhecida por equação de Higuchi, gera uma reta e seu coeficiente angular está relacionado à velocidade de liberação (RATHBONE et al., 2002; PIMENTEL, 2006, MARIANO et al., 2010). Atualmente, existem adptações da técnica de Higuchi (MARIANO et al., 2010).

Rathbone et al. (2002) obtiveram coeficientes angulares de 1.300 µg/cm2/t1/2, utilizando o modelo de Higuchi, em dispositivos confeccionados de PCL com 10% de P4, este valor é aproximado com o do CIDR (Controlled Internal Drug Release), de 1.228.52 µg/cm2/t1/2

2.2.4 Receptores de P4 e de E2

Nos *Bos taurus taurus*, o número dos receptores de P4 (PR) e estrógeno (ER) no endométrio modificam-se ao longo do ciclo estral, sendo maior durante o proestro e estro que durante a fase luteínica média (dias 9 a 14) (ROBINSON et al*.,* 2001). Essa mesma concentração de receptores foi observada em *Bos taurus indicus* da raça Nelore (MARTIN et al*.*, 2008). O mesmo padrão de aumento ou diminuição, observado na concentração dos ER e PR endometriais, foi também encontrado na expressão do mRNA para esses receptores (ROBINSON et al., 2001), sugerindo a existência de mecanismos de regulação dos ER e PR endometriais que envolvem os próprios hormônios, pois o aumento da concentração de ER e PR endometriais acontece simultaneamente com a elevação da concentração plasmática e tecidual de E2 e está também relacionado com a diminuição da concentração plasmática de P4. Por outro lado, a prolongada exposição às elevadas concentrações de P4 que ocorre durante o diestro, promove efeito inibitório na concentração desses receptores. Essa hipótese foi comprovada *in vitro* por Xiao e Golf (1999), que demonstraram que o E2 ocasionou aumento da concentração do seu próprio receptor e do PR no epitélio e no estroma endometriais, enquanto a P4 não apresentou efeito similar, mas inibiu os efeitos do E2 na indução do aumento do

número de PR. Foi ainda observado que a P4 não inibiu a ação estimulatória do E2 sobre o próprio ER nas células epiteliais, demonstrando uma diferença na regulação do receptor entre os tipos celulares.

Os PR estão distribuídos amplamente no ovário, localizados no CL, células foliculares, indicando função intra-folicular desse hormônio, superfície do epitélio e células do estroma superficial e profundo (VAN DEN BROECK et al*.,* 2002). A menor expressão de PR nas células luteínicas, em relação às foliculares, indica um efeito de *down regulation* local da P4. Durante a prenhez, a redução da expressão destes receptores está relacionada ao longo período de exposição à P4 luteínica.

A ligação da P4 ao seu receptor é maior nas células luteínicas grandes que nas pequenas, o que indica envolvimento da P4 na regulação parácrina/autócrina da função luteínica. A expressão gênica do PR foi detectada no tecido luteínico bovino, com maior intensidade no início do desenvolvimento luteínico do que nos estágios tardios do desenvolvimento (SCHAMS; BERISHA, 2002).

2.2.5 Farmacocinética

Os hormônios esteróides são metabolizados (inativados) pelo fígado e excretados na urina e fezes (WILLIAMS, 1962) A meia vida plasmática da P4 é de 36,3 minutos (MILLER et al., 1963). O fígado inativa as moléculas esteróides de duas maneiras. Na primeira, qualquer dupla ligação é saturada e quando essas duplas ligações são reduzidas, a molécula é inativada. A segunda maneira de metabolização é quando o hormônio se liga a sulfatos ou glucuronatos residuais. O glucuronídeo forma com o hormônio esteroidal uma molécula hidrossolúvel o que lhe permite ser excretado na urina. Esse processo é importante porque não há ligações proteicas específicas para carrearem os esteróides até a bexiga. Os hormônios glicoprotéicos são facilmente degradados no trato digestivo pelas enzimas proteolíticos (SENGER, 2003).

Vacas em lactação requerem mais energia do que vacas não lactantes. A alta ingestão de matéria seca necessária à alta produção de leite, leva a um aumento

considerável do fluxo sanguíneo hepático, o que leva à alta metabolização de E2 e P4, causando a redução dos níveis circulantes destes hormônios, mesmo que esteja ocorrendo uma alta produção de hormônios esteróides pelo folículo ou CL. Este fato poderia explicar, ao menos em parte, a menor intensidade e duração dos estros expressos por estes animais de alta produção e pela diminuição do pico de E2 (WILTBANK et al. 2006).

Experimentos envolvendo a liberação contínua de P4, aumentaram o consumo de alimentos durante a lactação, consequentemente a circulação e excreção de metabólitos de P4 (PARR et al., 1993a, 1993b). Algumas mudanças reprodutivas, em vacas em lactação, são causadas pelo grande aumento no metabolismo dos esteróides, advindo do aumento da IMS e do fluxo sanguíneo hepático. O metabolismo de E2 e P4 foi 2,3 vezes maior em vacas em lactação, quando comparado àqueles encontrados em vacas secas (SANGSRITAVONG et al., 2002).

A biotransformação oxidativa de compostos lipofílicos no fígado, são mediadas por enzimas do citocromo P450 (PLANTA, 2007; PEGOLO et al., 2008). As isoformas do citocromo P450 CYP3A4, CYP2D6 , CYP2C9 , CYP2C19 , CYP2E1 e CYP1A2 são responsáveis pelo metabolismo oxidativo de mais de 90% dos medicamentos comercializados (HALKIER, 1996), sendo a de maior importância a CYP3A4, que é responsável pela metabolização de maior quantidade de moléculas do que todas as outras (GUENGERICH, 1997). O metabolismo progesterona em mamíferos é mediada principalmente pelas subfamílias CYP2C e CYP3A (GUENGERICH, 1997; LEMLEY et al., 2008). Esse processo está correlacionado negativamente às concentrações plasmáticas ou teciduais de insulina (BARNETT et al., 1990, .SHIMOJO et al. 1993).

Vacas leiteras suplementadas com dietas com milho obtiveram concentrações elevadas de insulina e diminuição da atividade da CYP3A e CYP2C devido ao aumento da secreção de insulina (LEMLEY et al., 2010). Deste modo, a maior taxa de depuração metabólica em vacas leiteiras de alta produção pode ainda resultar de um grande abundância relativa de CYP2C e CYP3A não só a partir de um aumento fluxo de sangue, como uma consequência de um maior consumo de matéria seca como geralmente relatado (SANGRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006).

2.2.6 Progesterona/Progestágenos

A partir de meados da década de 40, a utilização de P4 tornou-se possível pelo uso dos precursores de origem vegetal (RATHBONE, 2001), Nos anos 50 foram desenvolvidos progestágenos por via oral, sendo utilizados como contraceptivos para mulheres, e a partir dos anos 60, foram utilizados na sincronização do cio de bovinos, com o objetivo de mimetizar a fase luteínica, por um período que permitia a regressão do CL, levando à sincronização do estro, após 4 dias da retirada do agente progestacional. (MILES et al., 1994; RATHABONE, 2001). Alguns pesquisadores reportaram que a secreção de LH aumentou durante as 72 h que se seguiramm à suspensão abrupta da P4, pela remoção do dispositivo de P4 em vacas em anestro. (ROCHE et al., 1981; BARROS, 2004, MADUREIRA; PIMENTEL, 2005). Tratamentos com progestágenos por períodos prolongados (até 20 dias) sincronizavam o estro com precisão, porém a IA, após o estro sincronizado resultava em baixa taxa de prenhez (TRIMBERGER; HANSEL, 1955). Provavelmente, nos folículos persistentes, ocorre a maturação espontânea do oócito, acarretando quebra da vesícula germinativa e expansão do *cumulus* (REVAH; BUTLER, 1996). Tal diminuição da taxa de prenhez também pode ser devida à alteração do ambiente uterino que prejudicaria o transporte dos espermatozóides (BALL; PETERS, 2006). Existem no mercado, dois tipos de implantes de P4 e/ou progestágenos para sincronização de cio e ovulação: dispositivos intravaginais e via auricular subcutânea. Esses produtos estão associados a outros hormônios nos protocolos de IATF, como por exemplo, valerato de estradiol, benzoato de estradiol, PGF2α e GnRH (ANDERSON; DAY, 1998).

Acredita-se que após o parto, as vacas necessitem de um primeiro contato com a P4 para desenvolver um CL com vida funcional normal (BARROS, 2004). Os progestágeno são utilizados para mimetizar o ciclo estral curto que normalmente ocorre após a primeira ovulação pós-parto (GONZALEZ-PADILHA et al., 1975). O tratamento com P4, por períodos de sete a nove dias no pós-parto, pode restabelecer a ciclicidade em vacas em anestro e diminuir a ocorrência de ciclos curtos (RHODES et al., 2002; MADUREIRA; PIMENTEL, 2005; SÁ FILHO et al.,

2009). Seguindo esse raciocínio, Rhodes et al. (2003) hipotetizaram que o restabelecimento da ciclícidade de vacas em anestro ocorre pelo aumento da secreção de LH, desenvolvimento de receptores de LH e a síntese de estradiol, acarretando desenvolvimento e posterirmente maturação do folículo dominante. Durante a exposição à P4/progestágenos ocorre a modificação da dinâmica folicular, reduzindo a concentração de ER no hipotálamo, diminuindo o feedback negativo sobre a liberação do GnRH e aumentando a secreção de LH (PETERS et al., 1994; DAY; ANDERSON, 1998).

O tratamento com dispostivos à base de progestágenos induz a puberdade em novilhas. Após a remoção dos dispositivos ocorre o aumento da secreção de LH e aceleração da diminuição do “feedback” do estradiol, atuando negativamente no controle da secreção de LH. Fatores como idade, peso corporal, raça e status folicular, no início do tratamento, são responsáveis por variações na eficiência desses tratamentos (ANDERSON et al., 1996; RASBY et al., 1998).

A P4 nos protocolos de IATF tem como principal função sincronizar o crescimento folicular, possibilitando que os animais tratados possuam um folículo em desenvolvimento, com grande quantidade de receptores de LH que confere capacidade ovulatória, na remoção do implante ou no momento da aplicação de PGF (KASTELIC; GINTHER, 1991).

2.3 ESTRADIOL

Os estrógenos podem estimular ou inibir a liberação de gonadotrofinas, dependendo da dose e das concentrações de P4. São capazes de conferir ação luteolítica (WILTBANK et al., 1961), pelo estímulo da produção de PGF endógena, principalmente os de meia vida longa, quando utilizados no início do protocolo. Dessa maneira não há necessidade de utilizar uma PGF no momento da retirada do implante (PETERSON; HUHN; KESLER, 2000); BÓ et.al., 2002). P4/Progestágenos associados com E2, bloqueiam os centros tônicos e pulsáteis do hipotálamo,

causando inicialmente, inibição da síntese e liberação das gonadotrofinas (*feed-back* negativo), acarretando a supressão na secreção de FSH e LH, levando à atresia dos folículos. Posteriormente, ocorrerá a liberação de um pico de FSH, gerando a emergência de uma nova onda independente da fase do ciclo estral (BÓ et al*.,* 1995). A inibição da síntese ocorre principalmente pela redução da transcrição do gene que codifica a subunidade β do FSH e pela redução da estabilidade do RNA mensageiro (ROCHE, 1996). A associação entre esses dois hormônios, também é capaz de induzir o retorno à ciclicidade em vacas em anestro no pós-parto (BRIDGE et al.,1999). Outra vantagem é impedir a formação de folículos persistentes, que prejudicam a eficiência do protocolo, influenciando negativamente na taxa de prenhez (BARUSELLI et al., 2004).

Os estrógenos possuem meia vida diferente o que influenciará no início da emergência da nova onda de crescimento folicular. Bó et al. (1994), reportaram que um tratamento com 5 mg de 17β-estradiol, no dia da colocação de um implante vaginal de P4, resultou na emergência sincronizada de uma nova onda folicular, 4 a 5 dias depois, independentemente do estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento do tratamento. Segundo os mesmos autores o mecanismo pelo qual a associação de estradiol e P4 induziu a atresia da onda folicular, envolveu a supressão dos teores de FSH e de LH. De fato, os teores de FSH decresceram cerca de 6 horas após a aplicação de 17β-estradiol e foram aumentando gradativamente após 24 a 42 horas. Martínez et al*.* (2000) verificaram que, em novilhas tratadas com P4 em associação ao17β-estradiol, uma nova onda folicular emergiu entre 3 e 4 dias após o tratamento. Acrescentaram que a variabilidade no diâmetro dos folículos, no momento da remoção do dispositivo vaginal de P4, foi muito pequena (variação de 3 mm) e, por fim, concluíram que o tratamento possibilitou a sincronização do estro e da ovulação, com taxas de prenhez altamente aceitáveis, após a IATF.

Moreno et al. (2001) tratando fêmeas com benzoato de estradiol observaram a emergência de uma nova onda 4,1 ± 0,1 dias, com variação de 3,5 a 5 dias. Mapletoft et al. (1999) estudaram o valerato de estradiol e Thundathil et al. (1998) o cipionato de estradiol. Estes estrógenos nos protocolos de IATF têm baixa eficiência

para sincronizar a onda, pois têm a meia vida e o clearence sanguíneo mais longo (valerato de estradiol em torno de 6 a 7 dias), aumentando a dispersão da divergência da nova onda quando comparada ao 17β-estradiol (BÓ et al., 1995) e benzoato de estradiol (CACCIA; BÓ, 1998), sendo este último, o mais utilizado nos protocolos de IATF atualmente (BÓ, 2003).

Uma forma mecânica de induzir uma nova onda crescimento folicular (em torno de 1,9 ± 0,1 dias) é a aspiração por uma sonda guiada por ultrassom dos folículos com diâmetro maior que 5mm (BURATINI et al., 2000).

Os estrógenos também têm a função de induzir a ovulção em protocolos de IATF, causando um pico de LH, aproximadamente 16 a 24 horas após o tratamento e a ovulação de 24 a 32 horas após o pico (SALES et.al., 2012), quando aplicada a dose de 1mg de BE, após a remoção do dispositivo, sendo indicada a IA 52 a 56 horas após a esse procedimento. Esse hormônio é fundamental para a sincronização da ovulação (LEMASTER et al., 1999; MADUREIRA; BARUSELLI; MARQUES, 2000), obtendo assim melhores taxas de prenhez (COLAZO et al., 1999). O cipionato e o benzoato de estradiol, quando utilizados como indutores de ovulação, apresentaram boa eficácia e taxas de prenhez equivalentes, em vacas *Bos indicus* lactantes (SALES et.al., 2012)

2.4 ECG

A gonadotrofina coriônica equina é um hormônio glicoproteico de meia vida longa (atua por até 3 dias), produzido nos cálices endometriais de éguas prenhes, formada por unidades α e β e possui efeitos similares a LH e FSH em uma mesma molécula (MURPHY; MARTINUK, 1990). Aplicado antes e durante a seleção e divergência, pode levar à superovulação, sendo o primeiro hormônio utilizado para esse fim (HAFEZ, 2004). Entretanto, quando utilizados em programas de IATF, após a retirada da P4, confere uma ação luteinizante e folículo estimulante (BARUSELLI et al., 2008).

Avaliações ovarianas por palpação ou ecografia devem ser feitas em algumas categorias de vacas zebuínas multiparas para a utilização racional desse hormônio nos protocolos, aplicando apenas nas fêmeas acíclicas, obtendo melhor relação custo/benefício. (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005). Esse hormônio é importante para aumentar o crescimento do folículo dominante, conferindo efeito de FSH, incrementando a taxa de ovulação e de prenhez de fêmeas que apresentam escore de condição corporal insastifatório e com alta incidência de anestro (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005; SALES et al., 2011; SALES et al., 2012). Também é indicado para vacas em manejo de desmame precoce ou protocoladas com menos de 45 dias pós parto (ROSSA et al., 2009). Entretanto, seu uso pode ser desnecessário em vacas com boa condição corporal e cíclicas, não refletindo melhorias nos índices reprodutivos (BARUSELLI et al., 2004).

Existe uma preocupação com a reação imunológica causada por essa glicoproteína heteróloga de alto peso molecular (MURPHY; MARTINUK, 1990), podendo ocorrer após usos consecutivos em bovinos (DRION et al., 2001). Após testes observando níveis de anticorpos e memória imunológica humoral nos tratamentos sucessivos com doses de 400 e 2000UI de eCG, Mantovani (2010) propôs que, o uso de eCG, nas doses recomendadas para os protocolos de IATF, apresentam baixos riscos de causar efeitos adversos nos próximos tratamentos.

2.5 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO NOS PROTOCOLOS DE IATF

O estro pode ser sincronizado pelo emprego da PGF ou seus análogos, com objetivo de causar a lise do CL. Porém, ocorre uma grande variação da resposta a esse tratamento, acarretando distribuição de cios em um grande intervalo de tempo. A PGF pode ser utilizada em associação ao tratamento com P4 exógena ou progestágenos sintéticos, no momento da retirada dos implantes para permitir que todos os animais manifestem estro e/ ou ovulem (RATHBONE et al., 2001)

Princípios báscios para protocolos hormonais visando a sicronização da ovulação:

1) Indução de fase progestacional por 7 a 10 dias, obtida pela colocação de um implante vaginal ou auricular de P4 ou progestágeno;

2) Emergência sincronizada de nova onda folicular, durante o período progestacional, pela indução da ovulação em folículos pré ovulatórios utilizando GNRH, ou pela aplicação de E2 e o dispositivo de P4, acarretando na atresia dos folículos.

3) Encerramento da fase progestacional em todas as fêmeas tratadas pela retirada dos implantes e aplicação de PGF;

4) Sincronização do pico pré-ovulatório de LH, pela aplicação de ésteres de estradiol, GnRH, LH, hCG.

2.6 PROSTAGLANDINA

Os análogos sintéticos das prostaglandinas são hormônios comerciais utilizados com frequência para controlar o ciclo estral, atuando por meio da regressão do CL (ODDE,1990). No entanto, uma das limitações da utilização de PGF é a baixa taxa de sincronização na indução do cio, gerando uma resposta ao tratamento que é distribuído ao longo de seis dias, e é influenciado, não apenas pela responsividade do CL, mas também pelo estágio de desenvolvimento do folículo dominante (SAVIO et al., 1990; KASTELIC; GINTHER, 1991; WILTBANK et al.,1996b). A alta variabilidade de resposta aos tratamentos com PGF é explicada pelo fato de vacas Bos indicus criadas em condições tropicais apresentaram alta incidência de anestro pós-parto (BARUSSELLI et al., 2005). Mesmo com CL funcional, várias pesquisas realizadas em rebanhos predominantemetente zebuínos apresentaram variações na resposta ao tratamento com PGF e, consequentemente, na manifestação de estro, Hardin et al. (1980) e Landivar et al. (1985) obtiveram índices menores que 40%, enquanto outros autores observaram valores acima de 70% (LOPEZ-BARBELLA et al., 1981; OYEDIPE et al., 1986), após a administração

de PGF. Uma estratégia para evitar que a PGF seja aplicada no início do ciclo é a repetição da aplicação 11 a 14 dias após aplicação da primeira dose (ODDE, 1990)

A administração de uma dose de PGF 24 a 48 h antes da retirada dos implantes de P4 (ODDE, 1990; MACMILLAN; PETERSON, 1993; MACMILLAN et al., 1995; KASTELIC et al., 1997), ou mesmo no momento da retirada (BARUSELLI, 2006), promove a sincronização do estro. Segundo Schmitt et al. (1996) é possível que, após a remoção do progestágeno e a aplicação de uma dose de PGF, ocorra o aumento da secreção pulsátil de LH, permitindo um crescimento uniforme do folículo pré-ovulatório, sincronizando a ovulação.

A PGF vem sendo amplamente difundida como estratégia para melhorar a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras. Duas injecções de PGF são aplicadas, com intervalo de 14 dias e, após 12 dias da aplicação da segunda injeção, inicia-se o protocolo e Ovsynch. A pré sincronização com esse hormônio aumenta o número de vacas ovuladas ao primeiro GnRH e as taxas prenhez, pois com esse protocolo as vacas apresentam folículo com capacidade ovulatória, no momento da aplicação do primeiro GnRH. Duas injecções de PGF são aplicadas, com intervalo de 14 dias e, após 12 dias da aplicação da segunda injeção, inicia-se o protocolo e Ovsynch. (THATCHER et al., 2002).

3. HIPÓTESES

As hipóteses levantadas para os três experimentos serão descritas.

3.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

O dispositivo contendo 1g de P4 apresentará maior liberação de P4, quando comparado ao dispositivo que possuí 0,558 g de P4.

3.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS OVARIECTOMIZADAS

Os dispositivos de 1g apresentará maiores concentrações plasmáticas de P4, quando comparado ao de 0,558g.

3.3 DINÂMICA FOLICULAR

Como os teores plasmáticos de P4 diferem, é esperada diferenças nos padrões de desenvolvimento folicular proporcionadas por vacas de corte.

4 OBJETIVO GERAL

4.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

Comparar a cinética de liberação de P4 *in vitro* do dispositivo contendo 0,558 g de P4 com o de 1g de P4.

4.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS OVARIECTOMIZADAS

Avaliar as concentrções séricas de P4, utilizando-se para isso vacas ovariectomizadas, implantadas com os dispositivos intravaginais de silicone, contendo diferentes quantidade de P4.

4.3 DINÂMICA FOLICULAR

Explanar o desenvolvimento folicular de vacas multíparas cíclicas tratadas por dipositivos contendo 1g ou 0,558g e dosar a concentração sérica de P4 nos dias 6 ,7 e 8.

4.3.1 Objetivos específicos

Avaliar o momento da ovulação, o tamanho do folículo pré ovulatório, a emergência da nova onda de crescimento folicular e a taxa de ovulação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos estão dividos em: teste *in vitro*, teste *in vivo* e de dinâmica folicular.

5.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

5.1.1 Local

As atividades experimentais foram realizadas no ano de 2012 no Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus de Pirassununga. As dosagens de P4 foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP).

5.1.2 Delineamento experimental

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os implantes foram analisados em duplicata, com os dispositivos Cronipres® (3usos x monodose). Para realizar esse ensaio foi utilizado um dissolutor de comprimidos (Nova Ética mod. 299), com 6 cubas e capacidade para 1000 mL por cuba. As cubas foram preenchidas com uma mistura de álcool e água na proporção de 60:40. Os dispositivos foram cortados, selados com silicone e secados por 24h, fixados às hastes giratórias do dissolutor, e depois foram mergulhados nas cubas a uma temperatura de 38°C e a velocidade de agitação de 150 RPM (BUNT et al., 1997). Amostras de 1 mL foram colhidas nos seguintes momentos: 2min., 24, 48, 72 e 96 horas após a imersão dos implantes nas cubas. Após a colhieta, as amostras foram filtradas em filtro Millipore® (0,45 µm), acondicionadas em tubos de vidro com 1,5 ml de capacidade e mantidas em geladeira à 4°C, até o momento das dosagens.

Para a dosagem de P4, empregou-se a técnica de cromatografia de alto desempenho (HPLC), como se segue:

A fase estacionária constou de uma coluna C18 ODS (Shin Pack CLC ODS, 0,15mm x 6,0 mm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água na proporção 60:40, em fluxo de 2mL/min. A detecção foi feita por espectrofotometria, em 240nm de comprimento de onda. As amostras de 10 µL foram injetadas automaticamente (ISS-200, PERKIN ELMER).

O tempo esperado de retenção da P4 é de 1,6 - 4,4 min aproximadamente. Obtidas as concentrações de P4 das amostras, foi confeccionado um gráfico, no qual a raiz quadrada do tempo ocupou as abscissas e as concentrações de P4, por cm^2 de área do dispositivo, ocuparam as ordenadas. Foram calculadas as equações de regressão segundo dispositivo. Com base na quantidade acumulada de P4 liberada, foram calculadas as quantidades de P4 liberadas à cada 24 horas.

5.1.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis System (versão 9.3; SAS Institute, Cary, NC, USA), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE).

As equações de regressão foram obtidas utilizando-se o PROC REG do SAS, num modelo linear $y = a + bx$, onde se têm os coeficientes de determinação (R^2) e a probabilidade de efeito linear. As comparações dos coeficientes angulares (slopes) foram realizadas pelo PROC GLM do SAS.

Os coeficientes foram indicativos da velocidade de liberação de P_4 dos dispositivos e foram expressos em µg de P_4 por cm^2, em função da raiz quadrada do tempo.

A variável dependente “quantidade de P_4 liberada por dia (mg/dia)” foi submetida à Análise de Variância. À análise estatística desta variável foi ainda adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos 4 intervalos de 24h. A probabilidade de interação com tempo foi determinada pelo teste de Greenhouse-Geisser, utilizando-

se o comando REPEATED, gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Quando houve interação entre tempo e tratamento, as médias dentro de tempo foram analisadas pelo teste T. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância foi de 5%

5.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

5.2.1 Local

As atividades experimentais foram realizadas no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus de Pirassununga. Para isto, oito vacas, ovariectomizados, de cruzamento, com predominância de sangue zebuíno (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*). Os animais receberam sal mineral *ad libitum* no cocho e ficarão em piquetes de Braquiarão (*Brachiaria brizanta cv marandu*)

5.2.2 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento totalmente casualizado (8 vacas ovariectomizadas divididas em 2 grupos), adicionado de medidas repetidas no tempo, referentes aos 11 dias de colheita das amostras de sangue, tendo como variável dependente a concentração plasmática de P4.

Os implantes foram introduzidos na vagina, onde permaneceram por 11 dias seguidos. Quatro animais receberam o Cronipress® de três usos e outros quatro animais receberam o Cronipres Mono Dose®.

Amostras de sangue, foram colhidas em frascos tipo vacuntainer® (Becton Dickinson Company, EUA) com anticoagulante EDTA nos seguintes momentos: 0,2,4,8,12,24,48,96,144,192, 216, 240, 264 horas após a inserção do implante.
As amostras foram centrifugadas à 1500g, em temperatura de 4°C, por 15 minutos (Sorvall® RC3 Plus, EUA) e o plasma foi congelado. As dosagens dos teores plasmáticos de progesterona foram realizadas no laboratório ThoMson, da Universidade de Campinas UNICAMP, pela técnica de espectrometria de massas. (FERNANDES et al., 2011).

5.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Statistical Analysis (versão 9.3; SAS Institute, Cary, NC, USA) com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). A homogeneidade das variâncias foi avaliada teste de Shapiro-Wilk e PROC MEANS e a normalidade dos resíduos pelo PROC UNIVARIATE PROC UNIVARIATE, teste de Shapiro-Wilk e PROC MEANS.

Os teores plasmáticos por animal foram submetidos à análise de variância, pelo PROC MIXED do SAS, levando em consideração os efeitos fixos do tratamento e tempo.
A diferença estatística foi avaliada pelo teste t. O nível de significância adotado foi de 5%.

5.3 DINÂMICA FOLICULAR

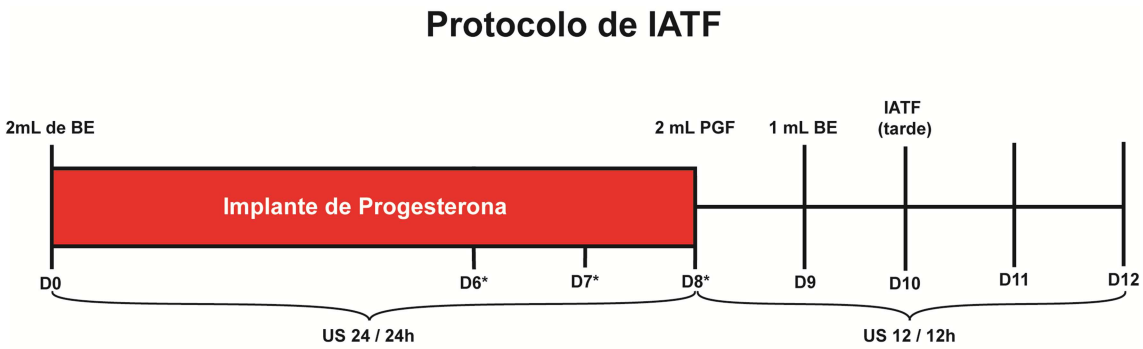
5.3.1 Animais e local do experimento

As atividades experimentais foram realizadas no setor de bovinocultura de corte no Campus de Pirassununga. Foram utilizadas 20 vacas multíparas e cíclicas da raça nelore. As vacas do grupo Cronipres® 3 usos apresentaram peso médio de 573,3 kg ± 39,84 e escore de condição corporal de 7,6 ± 0,5. Vacas do grupo Mono Dose pesavam na média 608 ± 60,47 e escore de condição corporal de 7,7 ± 0,5. Os animais permaneceram em seus piquetes de pastejo, com água e alimentação *ad libitum,* durante todo experimento, sendo apenas contidos para a administração dos fármacos, ultrassonografias e coletas de sangue e soltos novamente logo após o procedimento.

5.3.2 Manejo reprodutivo e tratamento

Neste estudo, foi avaliado o desenvolvimento folicular de vacas cíclicas multíparas, com idade entre 3 e 6 anos, submetidas a dois diferentes dispositivos intravaginais de P4, (A) 10 vacas receberam um dispositivo contendo 1 g de P4 (Cronipres® 3 usos, Biogénesis Bagó, Argentina), (B) 10 vacas receberam um dispostivo contendo 0,558 g de P4 (Cronipres® Mono Dose, Biogénesis Bagó, Argentina). No D0 (início do protocolo com a colocação do implante), todos os animais receberam uma injeção Intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Cronibest®, Biogénesis Bagó, Argentina) Oito dias após, os dispositivos foram removidos e foram aplicados 150 µg IM de D-cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó, Argentina) que é um análogo sintético da PGF2α. No dia seguinte, foi aplicada injeção contendo 1mg de Benzoato de Estradiol (BE, Cronibest®, Biogénesis Bagó, Argentina) (Figura 1)

Figura 1 - Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo



Notas: PGF: Cloprostenol sódico. BE: Benzoato de estradiol. US: Ultrassonografia. Asterisco (*): Coletas de sangue.

5.3.3 Exames ultrassonográficos

Escaneamentos transretais e mapeamentos dos ovários foram realizados à cada 24 horas, a partir da inserção do implante (D0), até a retirada do mesmo (dia 8). Após a retirada dos implantes, os ovários foram escaneados e mapeados a cada 12 horas, durante 4 dias, com o emprego de um aparelho de Ultra-som portátil, marca Mindray®, modelo DP 2200vet, acoplado a um transdutor linear de 5 MHz.

5.3.4 Coleta de sangue e análise de progesterona

Amostras de sangue foram coletadas utilizando tubos a vácuo sem EDTA (vacuntainer® Becton Dickinson Company, EUA) por punção da veia jugular nos dias 6, 7 e 8 do protocolo supradito, para determinar as concentrações séricas de P4 antes da retirada dos dispositivos.

As amostras de sangue foram centrifugadas à 1500g, em temperatura de 4°C, por 15 minutos (Sorvall® RC3 Plus, EUA) e o plasma foi congelado, até o momento das dosagens de P4. Foram comparados os teores plasmáticos de P_4, por espectrometria de massas. (FERNANDES et al 2011).

5.3.5 Análise Estatística

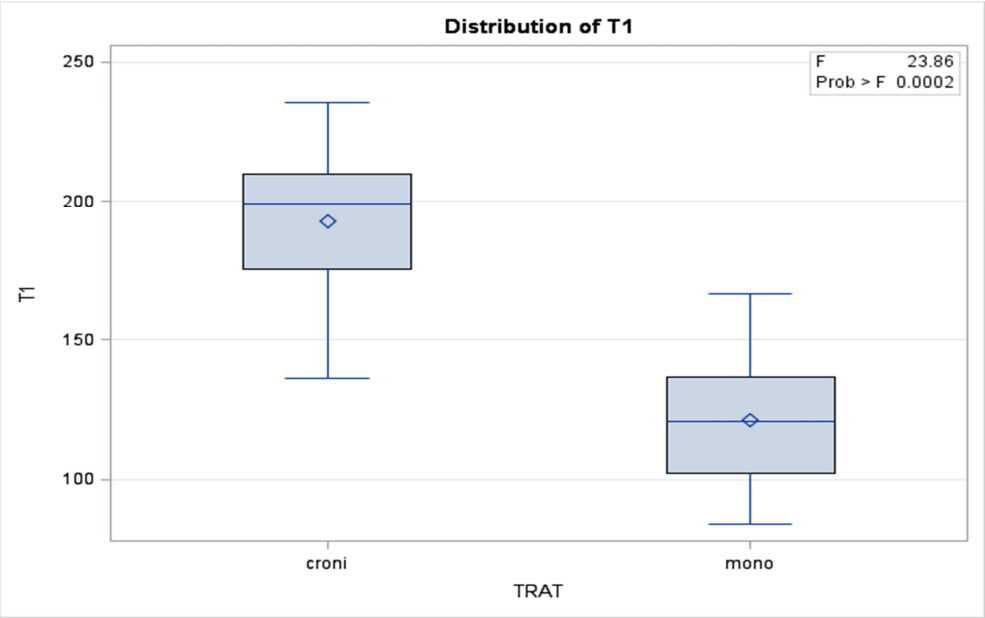
Foram avaliadas as variáveis: início da nova onda de crescimento folicular, diâmetro do folículo pré ovulatório, taxa de ovulação e momento da ovulação.
Os dados foram submetidos à análise de variância. Serão avaliadas as diferentes variáveis anteriormente citadas entre os grupos experimentais pelo Proc GLM do SAS (versão 9.3). As diferenças no crescimento diário até o momento da ovulação foram avaliadas pela utilização do Proc Mixed (SAS, versão 9.3).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

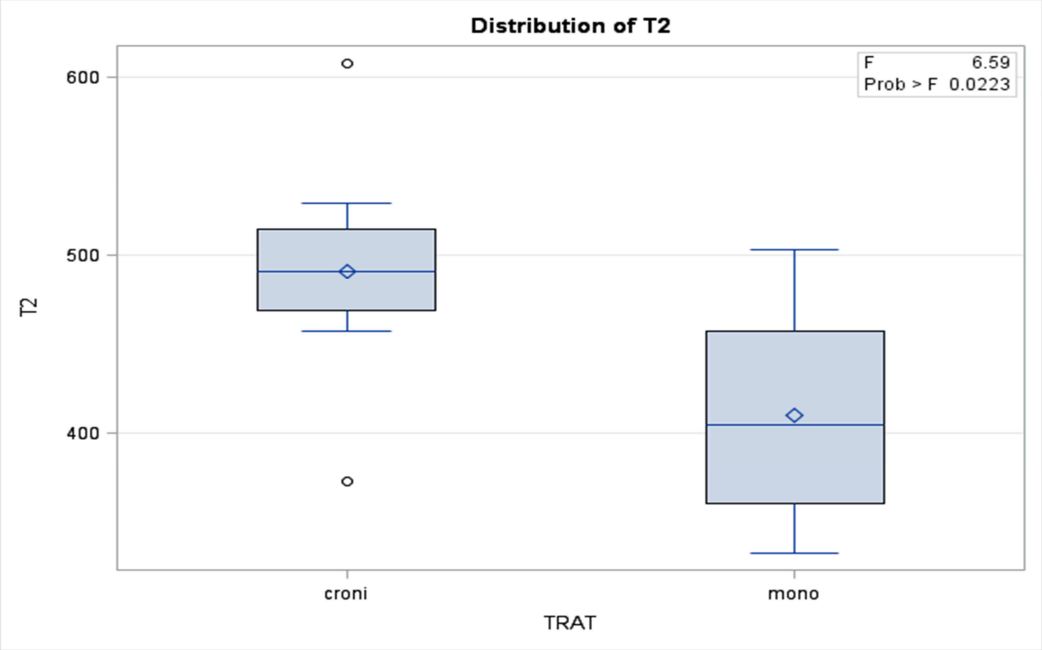
O dispositivo de 3 usos (1g de P4) liberou maior quantidade de P4 que o Mono Dose(0,558 g). As diferenças foram estatísticas ($p<0,05$), nos intervalos 1, (0 a 2 minutos) 4 (48 a 72 horas) . 5 (72 a 96 horas).
Tendo em vista que as liberações de um fármaco em matrizes de silicone são dependentes da área e das cargas iniciais deste fármaco (RATHBONE et al., 2002), a equação de Higuchi pode ser aplicada aos dados, levando em consideração a liberação de P4 pela área do implante em função da raiz quadrada do tempo.
O coeficiente angular da reta obtido no implante de 3 usos, resulta em (62,39 mg/ dispositivo/t1/2), e no Mono Dose (53,31 mg/ dispositivo/t1/2), transformado em µg e dividido pela área, apresenta um valor de 253 µg/cm2/t1/2 e 719,43 µg/cm2/t1/2 respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 1 – Liberação acumulada de P4 no tempo 1 (2min)



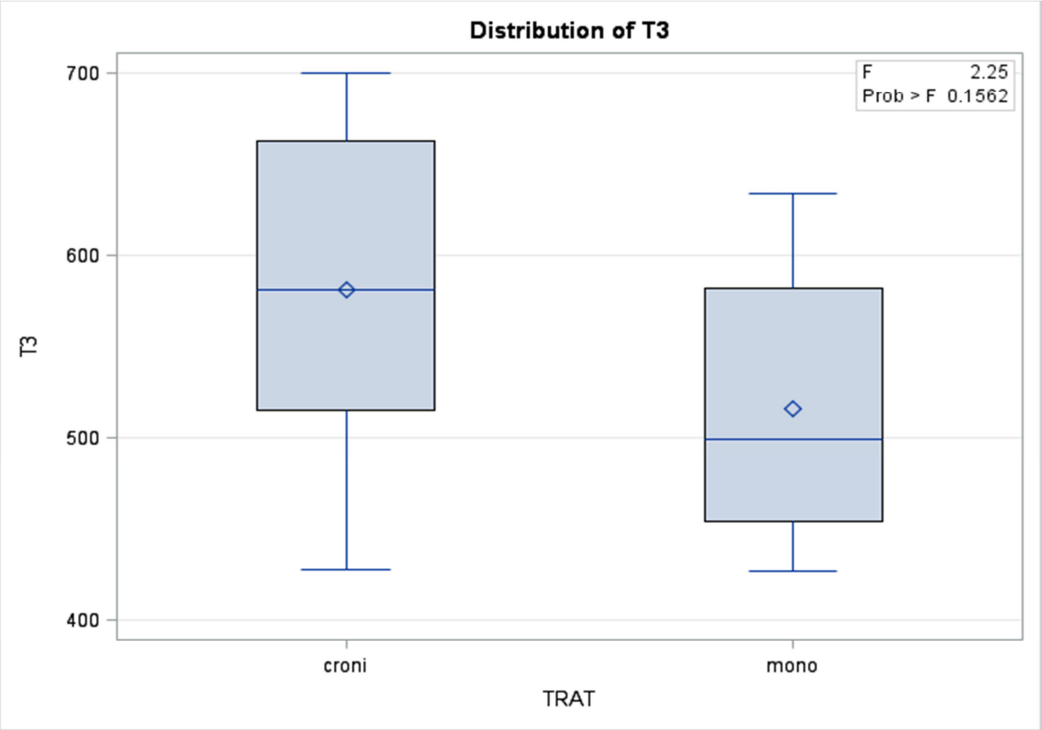
Notas: **T1**: Tempo 1. **Croni**: Cronipres 3 usos. **Mono**: Cronipres Mono Dose.

Gráfico 2 – Liberação acumulada de P4 no tempo 2 (24 horas)



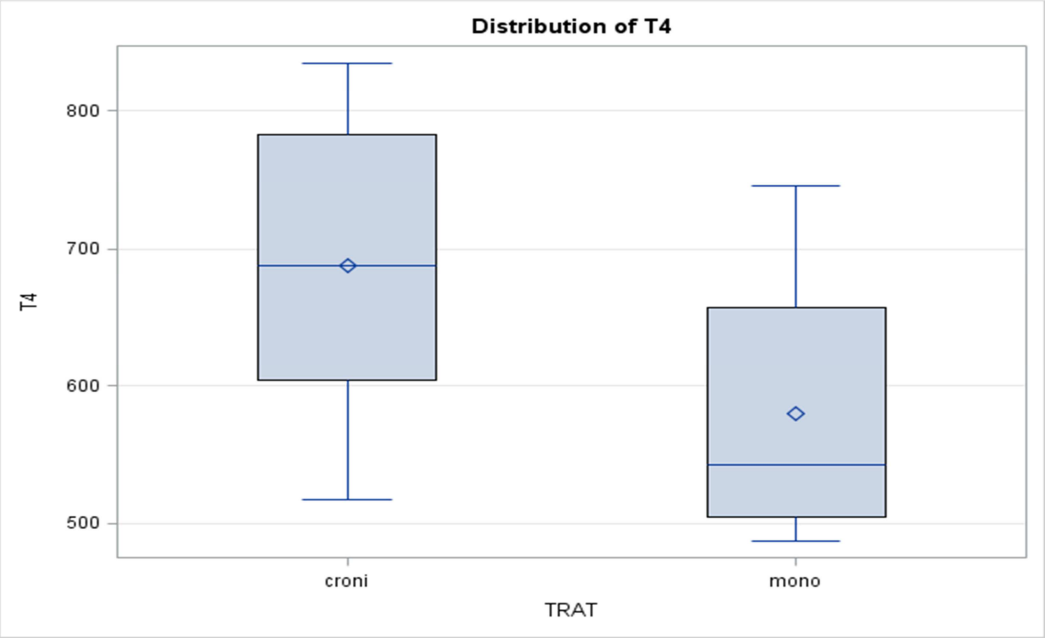
Notas: **T2**: Tempo 2. **Croni**: Cronipres 3 usos. **Mono**: Cronipres Mono Dose.

.Gráfico 3 – Liberação acumulada de P4 no tempo 3 (48 horas)



Notas: **T2**: Tempo 2. **Croni**: Cronipres 3 usos. **Mono**: Cronipres Mono Dose.

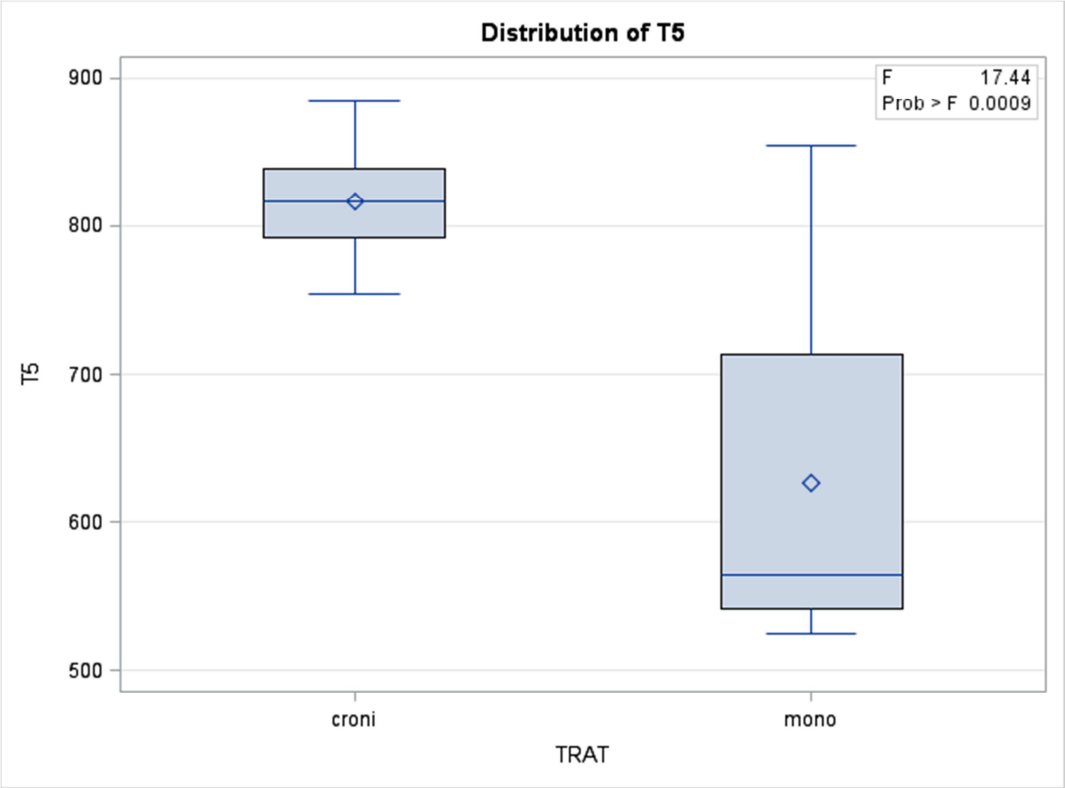
Gráfico 4 - Liberação de P4 acumulada no tempo 4 (72 horas)



Notas: **T4**: Tempo 4. **Croni**: Cronipres 3 usos. **Mono**: Cronipres Mono Dose.

FONTE: (SANTIN, 2013).

Gráfico 5 – Liberação acumulada de P4 no tempo 5 (96 horas)



Notas: **T5**: Tempo 5. **Croni**: Cronipres 3 usos. **Mono**: Cronipres Mono Dose

Gráfico 6 - Quantidade acumulada de P4 (mg) em função da raiz quadrada do tempo.

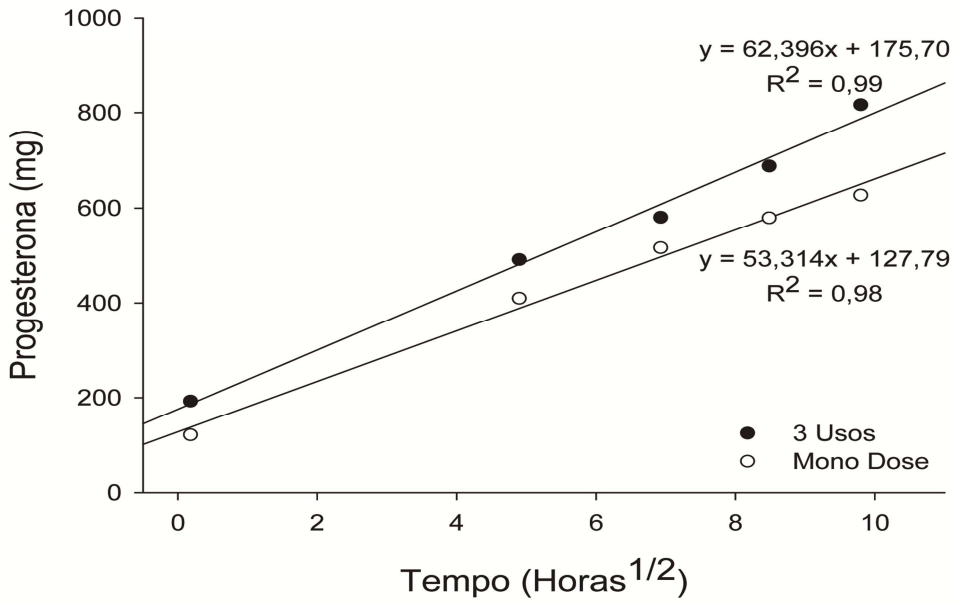
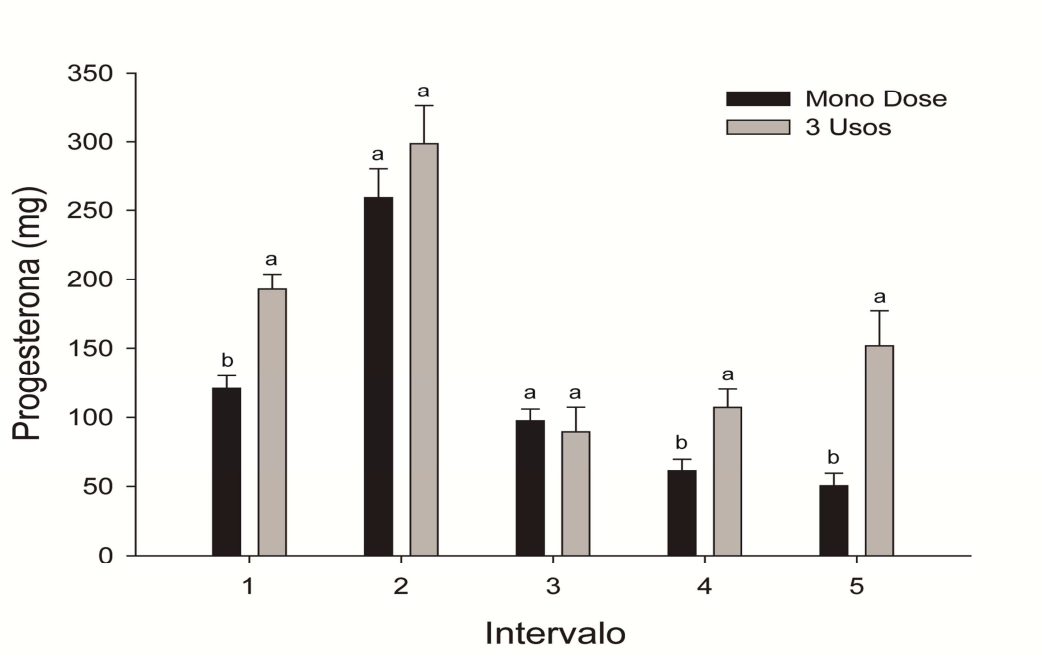


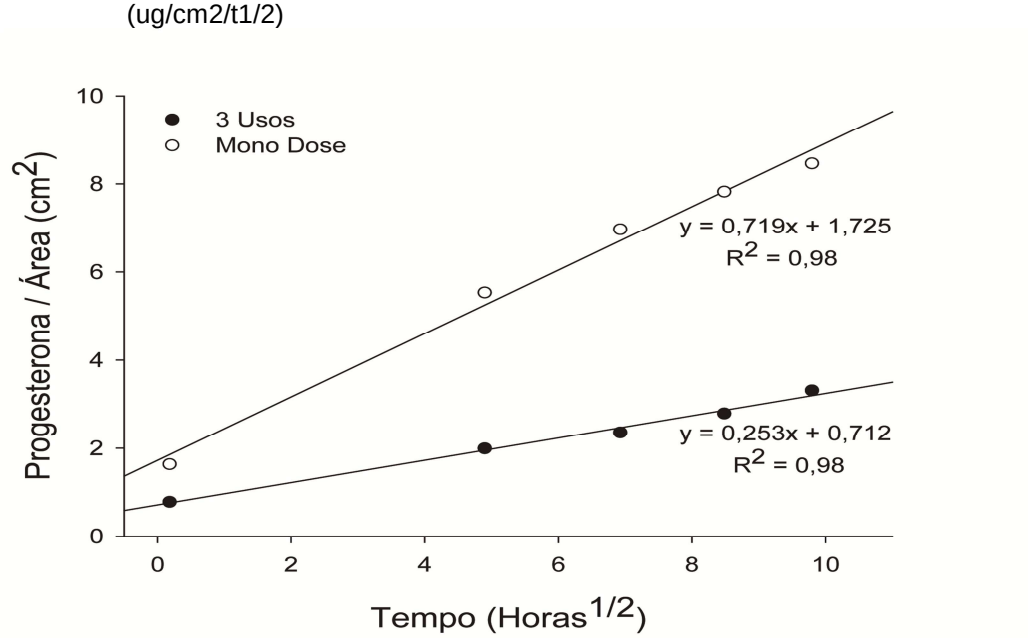
Gráfico 7 – Liberação diária de P4. Cronipres® Mono Dose e de 3 usos.



Notas: Intervalos: **1** (0 a 2 minutos). **2** (2 minutos a 24 horas). **3** (24 a 48 horas). **4** (48 a 72 horas). **5** (72 a 96 horas).

Fonte: Santin, T. (2013).

Gráfico 8 - Liberação de P4 acumulada por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo (ug/cm2/t1/2)



A quantidade de P4 acumulada em função do tempo para o Cronipres® 3 usos, alcançou maiores valores do que a do Mono Dose, sendo essa diferença caracterizada pelo maior coeficiente angular da reta.

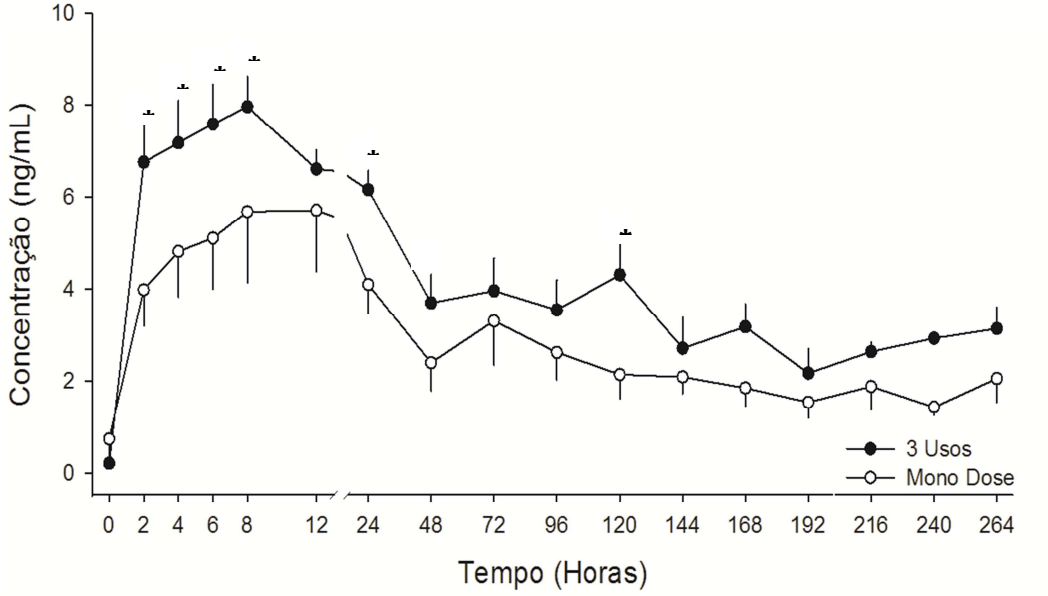
6.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Houve efeito de tempo p = 0.0219 e de tratamento p= 0,0219 (Tabela 1). Não houve interação entre tempo e tratamento. Houve diferença estatística durante os tempos 2, 4, 6, 8, 24 e 120. O pico de concentração sérica nos dois grupos,ocorreu após 8 horas da inserção do implante (Gráfico 9).

Tabela 1 - Interação de tempo e tratamento.

Efeito	**Valor de P**
Tratamento	0.0219
Hora	< 0,001
Tratamento*Hora	0.3655

Gráfico 9 – Teores plasmáticos de P4 (ng/ml) em função do tempo.



Notas: Um asterisco (*) indica diferença significativa (P < 0,05) entre os tratamentos.

Pimentel (2006), encontrou taxa de liberação bastante semelhante para o dispositivo DIB® (677,39±16,13 µg/cm2/t1/2) com carga inicial de 1g de P4.(gráfico – 8)
A área do Cronipres® 3usos é 3,3 vezes maior que a área do Cronipress Mono Dose®. A porcentagem de P4 do dispositivo de 3 usos é de 3,6%, enquanto a do Mono dose é de 5%, portanto o Mono dose libera maior quantidade de P4 por área quando comparado ao dispositivo de 3 usos.(gráfico 8)

A média do valor inicial (0min) de P4 encontrado nesse estudo foi de 0,48 ng/ml, semelhante o encontrado por Holleisten et al. (2005) em vacas ovariectomizadas. Esses valores são atribuídos à produção desse hormônio pela adrenal. A média do valor inicial de P4 encontrado nesse estudo foi de 0,48 ng/ml.Os dispositivos de P4 são utilizados normalmente por um período de 7 a 8 dias em um protoco de IATF. Vários autores recomendam no mínimo 1 ng/ml por ml e Rathbone et al. (2002) recomendam que os dipositivos proporcionem pelo menos um teor plasmático de P_4 de 2,0 ng/mL no momento de sua retirada. Esses mesmos autores, compararam dois dispositivos, um confeccionado a base de PCL (2,2 g de P4e área de 142 cm2) com O CIDR (1,9G DE P4 e 120 cm2 de área), e encontraram, teores em torno de

2,0 ng/mL para o CIDR® com 1,9g de P_4, no mesmo ano, em outro experimento, detectaram 2,5 ng/mL, também utilizando o CIDR® com 1,9g de P_4. Pimentel (2006) utilizando DIB® e um dispositivo confeccionado com uma blenda de PHB-V + PCL, encontrou, respectivamente, valores de 2,44 e 1,89 ng/mL de P_4 plasmática, no oitavo dia de tratamento. Macmillan et al. (1991b), detectaram teores em torno de 3,2 ng/mL de P_4, no dia 8, utilizando CIDR® com 1,9g de P_4, porém neste caso, a técnica de RIA utilizada para dosar a P_4 foi diferente, o que pode impedir comparações diretas, com os resultados do presente estudo. No presente estudo, no D8, foram encontrados valores médios de 2,2 ng/ml para o Cronipres® de 3 usos e de 1,55 para o Mono Dose, ressaltando que essas amostras foram dosadas pela técnica de espectrometria de massas (FERNADES, 2011), portanto a direta comparação dos valores das amostras dosadas por Rádio Imuno Ensaio, devem ser avaliadas com cautela.

Não houve interação de tempo e tratamento, houve efeito de tempo p = 0.0126 e tratamento p=0,00. Houve diferenças estatística nos tempos 2, 4, 6, 8, O pico de concentração sérica nos dois tratamentos, aconteceu após 8 horas da inserção do implante. Rathbone et al. (2002), ao compararem os teores plasmáticos de P_4 de PCL com o CIDR®, verificaram que as concentrações máximas foram menores e o tempo para atingi-las foi maior do que os encontrados neste estudo. O CIDR® atingiu concentração máxima de 5,1 ng/mL, 14,4 h após ter sido colocado, enquanto que o dispositivo à base de PCL atingiu a concentração máxima de 5,3 ng/mL após 9,6 horas. Pimentel (2006) utilizando DIB® e um dispositivo confeccionado com uma blenda de PHB-V + PCL, encontrou pico sérico após 4 horas da inserção do implante.

6.3 DINÂMICA FOLICULAR

A taxa de ovulação foi de 80% para ambos os grupos (P>0,05). Houve uma tendência de antecipação da ovulação (P=0.07), das vacas do grupo B. Uma vaca do grupo B antecipou a ovulação em cerca de 36 h.. Não houve diferença no

tamanho do folículo pré ovulatório e na emergência da nova onda de crescimento folicular. (Tabela 2).

Os animais tratados com os dispositivos intravaginais contendo 0,558g e 1g de P4, não apresentaram diferença esattística (p>0,05) nos dia 6, 7 e 8 do protocolo hormonal. (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Concentração Sérica de P4 (ng/ mL) nos dias 6, 7 e 8

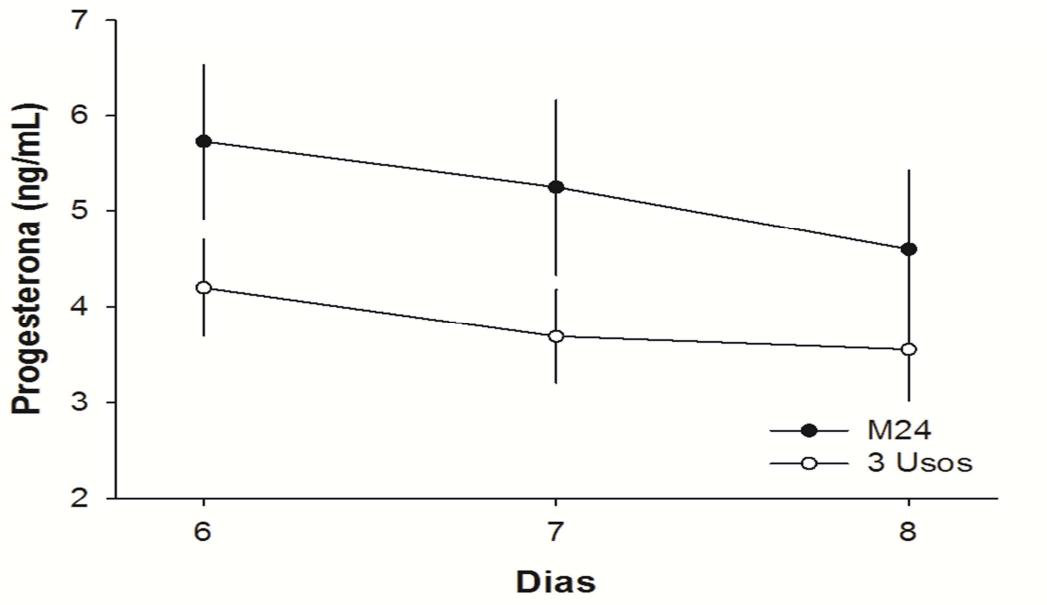


Tabela 2 - Dados de dinâmica folicular em vacas multíparas cíclicas tratadas com diferentes dispostivos intravaginais constituídos de silicone

	Grupo		
Parâmetro	**A (1 g)**	**B (0,558 g)**	**Valor de P**
Momento da ovulação (horas)	66,75 ± 2,1	60,0 ± 12,8	0,06
Emergência da nova onda (dias)	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,3	0,33
Diâmetro do FPO (mm)	13,8 ± 1,77	13,8 ± 1,0	0,74

Vacas cíclicas, tratadas com implante monodose, apresentam padrão de desenvolvimento folicular semelhante ao de vacas tratadas com implantes de 1 g de

P4, entretanto, houve uma tendência de antecipação da ovulação. Os folículos pré-ovulatórios apresentaram diâmetro similar no momento da IATF. A emergência de uma nova onda de crescimento folicular, para o grupo Cronipres 3 usos e Mono Dose, oocorreu 4,3±0,4 e 4,0 ± 0,3. Moreno et al. (2001) tratando fêmeas com benzoato de estradiol observaram a emergência de uma nova onda 4,1 ± 0,1 dias, valores muito próximos aos encontrados nesse experimento.

Não Hove diferença estatítica entre os tratamentos 3 usos e Mono Dose, nos dias 6, 7 e 8. Isso provavelmente se explica pela presença do corpo lúteo produzindo P4 nesse período.

7 CONCLUSÃO

Experimento *in vitro:* Comprovando a hipótese inicial, O Cronipres® três usos, contendo 1g apresentou maior liberação de P4, quando comparado ao Cronipres® Mono dose, contendo 0,558 g de P4, obedecendo a equação de Higuchi, segundo a qual a liberação se dá em função de raiz quadrado do tempo.

Experimento in vivo: Houve efeito de tempo e tratamento, nos teores plasmáticos, nos tratamentos Cronipres® 3usos e Mono Dose, aceitando a hipótese.

Experimento dinâmica folicular: Houve um desenvolvimento folicular semelhante. Isso demonstra que mesmo com menor concentração plsmática e menor liberação in vitro de P4 o dispositivo com 0,058 g de P4 foi eficiente no desenvolvimento folicular de vacas multíparas cíclicas, rejeitando a terceira e última hipótese.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 19-24, 1994.

ALMEIDA, A. B.; BERTAN, C. M.; ROSSA, L. A. F.; GASPAR, P. S.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou benzoato de estradiol em vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 456-465, 2006.

ALVAREZ, P., SPICER, L.J., CHASE JR., C.C., PAYTON, M.E., HAMILTON, T.D., STEWART, R.E., HAMMOND, A.C., OLSON, T.A.,WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during and estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science** v.78, p.1291–1302, 2000.

ANDERSON, L. H.; DAY, M. L. Development of a progestin- bases estrussyncronization program: I- Reprodutive response of cows fed melengestrol acetate for 20 days with as injection of progesterone. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1267-1272, 1998.

ANDERSON, L. H.; MACKDOWELL, L.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion on luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1025-1031, 1996.

ANTONIAZZI, A. Q.; HENKES, L. E.; OLIVEIRA, J. F.; HANSEN, T. R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. Ciência Rural, v.41, n.1, p.176-185, 2011.

APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L. C.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Expression, regulation and function of genomic and non-genomic progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 910–921, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL - ASBIA. **Manual de inseminação artificial.** São Paulo: Asbia, 2012. 89 p.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Ciclo ovariano. In: BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 38-52.

BARNETT, C. R.; GIBSON, G. G.; WOLF, C. R.; FLATT, P. R.; IOANNIDES, C. Induction of cytochrome P450III and P450IV family proteins in streptozocin-induced diabetes. **The Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 765-769. 1990.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arquivo Faculdade de Veterinária**, UFRGS, p.179-89, 1998. Supl. 26.

BARTOLOMEU, C. C.; DEL REI, A. J.; OLIVEIRA, M. A.; LIMA, P. F.; SILVA, J. E. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Anima**l, v. 27, n. 3, p. 426-427, 2003.

BARUFI, F. B.; MADUREIRA, E. H.; BARBUIO, J. P. Sincronização do estro e da ovulação em bovinos de corte com Crestar®, CIDR® ou CIDR® reutilizado, seguidos ou não pela administração de eCG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 226-229, 2002.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JUNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006. **Anais...**Londrina; UEL, 2004. V2 P.140-142

BARUSELLI, P. S.; BÓ, G. A.; REIS, E. L., MARQUES, M. O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina**. Anais...**, Londrina: UEL, 2004. v. 1, p. 155-165.

BARUSELLI, P. S.; BÓ, G.A.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; SÁ FILHO, M.F. Introdução da IATF no manejo reprodutivo de rebanhos bovinos de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 6., 2005, Córdoba – Argentina. **Anais...** Córdoba, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Córdoba, 2005, v. 1, p. 151-176.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da ECG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In*:* BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**,** 3.,2008,Londrina**. Anais…** Londrina**,** UEL**,** 2008, p.146-166*.*

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

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of a timed artificial insemination programs. **Animal Reproduction Science,** v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BAZER, F. W.; SPENCER T. E.; JONHSON G. A.; BURGHARDT, R. C. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Frontiers in Bioscience,** n. 3, p. 745–767, 2011.

BELTAMAN, M. E.; ROCHE, J. F.; LONERGAM, P.; FORDE, N.; CROWE, M. A. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 986 –992, 2009.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas de sincronização de crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 34, p. 1-7, 2006.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Dinâmica folicular ovárica em el bovino. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES.1, 2000, São Paulo**. Anais...,** São Paulo Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, 2000. p.14-34.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology***,* v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A., CUTAIA, L.; PERES, L.C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Society of Reproduction Fertility***,* v 64,p. 223-236, 2007.

BRIDGES, P.J., LEWIS, P.E., WAGNER, W.R. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated whit intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p.573-583,1999.

BUNT, C. R.; RATHABONE, M. J.; BURGGRAAF, S.; OGLE C. R. Development of a QC release assessment method for physically large veterinary product containing a highly water insoluble drug and the effect of formulation variables upon release Proc. **Controlled Release Society,** v. 24, p. 145-146, 1997.

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potenciates a prolonged progesterone-induced supression of LH release in ovariectomised cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p.68-78, 1989.

CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR®-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 49, p. 341, 1998.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.; 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.

DZIUK, P. J.; COOK, B. Passage of steroids through a silicone rubber. **Endocrinology**, v. 78, p. 208-211, 1966.

COLAZO, M. G.; SEFCHEK, M.; ILLUMINATI, H.; MEGLIA, G.; SCHMIDH, E.; BÓ, G. A. Fixed-timed artificial insemination in beef cattle using CIDR®-B devices, progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 51, p. 404, 1999.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, suppl. 2, p. 260–267, 2008.

DRION, P.V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J.Y.; MCNAMARA, E.M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J.F. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p.207-215, 2001.

ERB, R.E.; GARVERICK, H.A.; RANDEL, R.D.; BROWN, B.L.; CALLAHAN, C.J. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows. **Theriogenology**, v. 5, n. 5, p. 227-242, 1976.

FERNADES, R. M; GOMES, G. C., PORCARI, A. M.; PIMENTEL, J. R.; PORCIÚNCULA, P. M., MARTINS-JÚNIOR, H. A.; MIGUEZ, P. H.; COSTA, J. L.; AMARAL, P. H.; PERECIN, F; MEURER, E. C.; FURTADO, P.V.; SIMAS, R. C.; EBERLIN, M. N.; FERREIRA, C. R.; MADUREIRA, E. H. LC-MS/MS quantitation of plasma progesterone in cattle. **Theriogenology**, v.27, p. 1266-1274, 2011.

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

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

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

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal. Reproduction Science**, v. 42, p. 465-470, 1996.

GASSER, C. L.; BEHLKE,E. J.; BURKE,C. R.; GRUM, D. E.; MUSSARD,M. L. Improvement of pregnancy rate to fixedtime artificial insemination with progesterone treatment in anestrous pos-partum cows **Journal of Animal Science**, v.81,p.45 , 2003

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência follicular e da capacidade ovulatória em Bubalinos (*Bubalos bubalis)* e zebuínos (Bos indicus).** 2006, 113f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p.223-230, 1989a.

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

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p. 1187-1194, 1996.

GOLF, A.K.; SMITH, L.C. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. **Theriogenology**, v. 49, p. 1021–1030, 1998.

GONG, J. G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatrotopin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p. 611-622, 1996.

GONZALEZ-PADILHA, E.; NISWENDER, G.D.; WILTBANK, J. N. Puberty in heifers: Effect of injections of progesterone and estradiol 17-beta on serum LH, FSH and ovarian activity. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 1105-1109, 1975.

GRAY, C.A.; KRISTIN, C.; TAYLOR, M.; RAMSEY, W.S.; HILL, J.R.; FULLER, W. BAZER, F.W.; F. BARTOL, F.F.; THOMAS, E.; SPENCER, T.E. Endometrial Glands Are Required for Preimplantation Conceptus Elongation and Survival. **Biology Reproduction,** v. 64, 1608-1613, 2001.

GUENGERICH F.P. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. Activities of different forms of cytochrome P-450 towards several compounds of environmental interest. **Journal Biological Chemistry**, v. 252, p. 3970-3979, 1977

GUERRA, M.O. **Reprodução Feminina, fisiologia de hipotálamo, hipófise e ovário**. Editar: Juiz de Fora, 2001.

HAFEZ, E.S., HAFEZ B. **Reprodução Animal**. 7. ed, Barueri: Manole,2004.

HARDIN, D. R.; WARNICK, A. C.; FIELDS, M .J. Artificial insemination of subtropical commercial beef cattle following synchronization with cloprostenol. Estrous response. **Theriogenology**, v.14, p.259-68, 1980.

HOLLENSTEIN, K.; JANET, F.; BLEUL, U.; HASSIG, M.; KAHN, W.; THUN, R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress.**Animal Reproduction Science**, v11 , p1-1 2005.

INÁCIO, A. Produção de carne vira foco do setor de genética bovina. **Jornal Valor Econômico**. Publicado em: 18 jan. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2011**. Número 40, 2011. 60 p.

JUNQUEIRA, J. R.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p. 289-298, 2006.

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

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.23, p.169-180, 1990.

KASTELIC, J.P.; OLSON, W.O.; MARTINEZ, M.; MAPLETOFT, R.J. Sincronização do estro em bovinos Hereford-Angus com Crestar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p.101-3, 1997.

LANDIVAR, C.; GALINA, C. S.; DUCHATEAU, A. Fertility trial in zebu cattle after a natural or controlled estrus, with prostaglandin F2 alpha, comparing natural mating with artificial insemination. **Theriogenology***,* v.23, p.421-427, 1985.

LANGER, R. PEPPAS, N. A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. **Bioengineering, Food, and Natural Products**., v. 49: 2990–3006, 2003.

LEMASTER, J. W.; YELICH, J. V.; KEMPFER, J. R.; SCHRICK, F. N. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers treated with an intravaginal progesterone-releasing insert combination with prostaglandin F2alpha and estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1860-1868, 1999.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology,** v.72, p.1594–1601, 2011.

LOPEZ-BARBELLA, S., MARTINEZ, L.A., GAVALDON, L.L. Synchronization of estrous with norgestomet and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in beef cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v.6, p.101-4, 1981.

LOPEZ, H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. **Biology of Reproduction**. 788-795, 2005.

LUCY, M. C.; BILLINGS, H. J.; BUTLER, W. R.; EHNIS, L. R.; FIELDS, M. J.; KESLER, D. J.; KINDER, J. E.; MATTOS, R. C.; SHORT, R. E.; THATCHER, W. W.; WETTERMAN, R. P.; YELICH, J. V.; HAFS, H. D. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and injection of PGF2α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows , peripubertal beef heifers and dairy heifers . **Journal of Animal Science**., v. 79, p. 982-995, 2001.

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

MACMILLAN, K.L., PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Animal Reproduction Science***,* v.33, p.1-25, 1993.

MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W.W. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.45, p.883-9, 1991.

MACMILLAN, K.L.; TAUFA, V.K.; BARNES, D.R.; DAY, A.M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device**, Animal Reproduction Science**, v.26, p. 25-40, 1991

MADUREIRA, E.H. **Níveis de Progesterona determinados por Radio-Imuno-Ensaio em Plasma Sanguíneo e Leite Desnatado de Vacas da Raça GIR (Bos Indicus).**1988. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. **O. Controle farmacológico do ciclo estral em Ruminantes.** São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP, v.1, p.89-98, 2000.

MADUREIRA, E. H.; FERNANDES, R. H. R.; ROSSA, L. A. F. Anestro pós-parto e bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina: UEL. **Anais...**, Londrina:2006. p. 63-70.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal,B. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.16, Belo Horizonte **Anais...**Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, p120.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA A. B.; ROSSA, L. A. F. Sincronização com progestágenos, In: Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada, 1, São Paulo, **Anais...** São Paulo ,Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, 2004.p 246, .

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

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p.175–80, 2001.

MANTOVANI, Ana Paula. **Resposta imunológica contra gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilhas Bos taurus e Bos indicus**. 2010. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARIANO, R.N.; TURINO, L.N.; CABRERA, M.I.; SCÁNDALO, D.E.; MACIEL, M.G.; GRAU, R.J.A. A simple pharmacokinetic model linking plasma progesterone concentrations with the hormone released from bovine intravaginal inserts. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 250-256, 2010.

MARTIN, I; TORRES NETO, R.; OBA, E; BURATINI JR, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIN, R.; FERREIRA, J.C.P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. **Reproduction of. Domestic Animal**, v. 43, p. 415-421, 2008.

MARTINEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. **Theriogenology**, v. 59, p.224, 2003.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; ADAMS, G. P. Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In: **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina-PR; UEL **Anais…**, p.15-25, 2008.

MAPLETOFT, R. J.; MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J.; BURNLEY, C. A. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. **Theriogenology**, v. 51, p. 411, 1999.

MILES, R. A.; PAULSON, R. J.; LOBO, R. A. Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of Progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study. **Fertility and Sterility,** v. 62, p. 485-490, 1994.

MILVAE, R. A; HINCKLEY, S. T; CARSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

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

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

MORGAN, A. **IATF nos rebanhos bovinos tem inúmeras vantagens.** CPT – Centro de Produções Técnicas. Disponível em: <http://www.cpt.com.br/noticias/iatf-rebanhos-bovinos-vantagens-gado-corteleite>. Acesso em: 30 maio 2011.

MOTOMELO, K. C.; J. P. C.; GREYLLING J. P. C.; SCHWALBACH, M. J.; Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research***,* v. 45, p. 45-49, 2002.

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

NICHOLSON, M.J.; BUTTERWORTH, M.H. **A guide to condition scoring of Zebu cattle**. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 1986. 29p.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiologycal Reviews**, v. 80, p.1-29, 2000.

ODDE, K. G. A review of syncronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.817, 1990.

OYEDIPE, E. O.; VOH, A. A.; MARIRE, B. N. Plasma progesterone concentrations during the oestrus cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. **Brazilian Veterinary Journal***,* v. 142, p. 41-6, 1986.

PARR, R.A.; DAVIS, I. F.; MILES, M. A.; SQUIRES, T. J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 306-10, 1993a.

PARR, R. A.; DAVIS, I. F.; MILES, M. A.; SQUIRES, T. J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Research in Veterinary Science,** v. 55, p. 311-6, 1993b.

Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, SanchezT, Wehrman ME, Grotjan HE, Hamernik DL, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 5, p.1248–1254, 1994.

PETERSON, A. J. e HENDERSON, H. V. Plasma progesterone concentrations in ovariectomized dairy cows treated with a CIDR-B breeding device. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43 (suppl.), p. 308, 1991.

PETERSON, C.A.; HUHN, J.C.; KESLER, D.J. Norgestomet- and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. **Animal. Reproductin. Science**, v. 55, p. 253-259, 2000.

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

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.

PONTES, J. H. F; NONATO-JÚNIOR, B. V;. SANCHES, J. C.; ERENO-JUNIOR, S.; UVO, T. R. R.; BARREIROS, J. A.; OLIVEIRA, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo*and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows**. Theriogenology**, v.71, p.690-697, 2009.

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination

for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science,** v. 80, p. 295-300,1997.

RASBY, R.J.; DAY, M.L.; JOHNSON, S.K. Luteal function and estrus in peribubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, v. 50, p. 55-63, 1998.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R.; PICKERING, K. L. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 105-115, 2002.

RATHBONE, M.J.; KINDER, J.E.; FIKE, K.; KOJIMA, F. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.50, p. 277–320, 2001.

REGGIO, B.C.; LYNN, J.W.; GODKE, R.A. The effect of progesterone on the development of IVF-derived bovine embryos cultured in asemi-defined culture medium. **Theriogenology**, v. 47,p. 284, 1997.

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

RIBEIRO, P. H. P. R.; COSTA FILHO, L. C. C.; RODRIGUES, L. A.; ALVES, L. G. C.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, E. Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Maringá, 2009.

RICHARD, M. W.; SPITZER, J. C.; WARNER, M. B. Effect of varying levels of pospartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.62, p.300-306, 1986.

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

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.19-27, 1996.

RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal of Reproduction.Science***,* v. 69, p.139-150, 2002.

RHODES, F. M.; MACDOUGALL, S.; BURKE, C. R. Treatment of cows with an postpartum anestrous interval. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1876-1894, 2003.

ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Effect exogenous progesterone on time occurrence of the LH surge in heifers. **Journal of Animal Science,** v. 52, p. 580-586,1981.

ROGER, L.; GILCHRIST, L.; KI-SUNG, R.; INHAE, J; TAE, H. The Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor Has Distinct Transmembrane Conductors for cAMP and Inositol Phosphate Signals. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p. 19283-19287.

ROSSA, L. A. F.; BERTAN, C. M.; ALMEIDA, A. B.; GASPAR, P. S.; MAZZA, P. H.; BINELLI, M.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. Efeito da eCG ou benzoato de estradiol associado ao norgestomet na taxa de concepção de vacas de corte submetidas à IATF no pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 199-206, 2009.

RYAN, D. P.; BOLAND, M. P. Frequency of twin births among Holstein-Friesen cows in a warm dry climate. **Theriogenology**, v. 36, p. 1-10, 1991.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, 72:210-218, 2009.

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L.; REIS, T. A. N. P. S.; GALVÃO, K. N.; BARUSELLI, P. S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows **Theriogenology**, v. 79, p. 625–632, 2013.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user´s guide**: statisics. Versao 8.0. Cary: SAS, 2012.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.78, p. 510-516, 2012.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R. W.; SOUZA, J.C.; & BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. ***Animal reproduction science***, v*124*, p. 12-18, 2011.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17-β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M. F. Nutrição e reprodução em bovinos. **In II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina-PR. **Anais…**, 2006. p. 30-54.

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M. Ingestão de concentrado e concentração plasmática de progesterona em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p.1162-1167, 2006.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., HYNES, N., MATTIACI, M.R., ROCHE, J.F. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7. **Theriogenology***,* v. 33, p. 677, 1990.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology,**. v. 23, p. 53-65, 2002.

SCHMITT, E.J.P., DIAZ, T.C., DROST, M., ROOMES, C., THATCHER, W.W. Use of a GnRH agonist on human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **Jounal of Animal Science**, v. 74, p.1084-91, 1996.

SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and Uterine Morphology and Function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1026-1046, 1984.

SELK, G.E.; WETTEMANN, R.P.; LUSBY, K.S. et al. Relationships among weight change, body condition and reproductive performance of range beef cows. **Journal of Animal Science**, v.66, p.3153-3159, 1988.

SENEDA, M.M.; SILVA, K.C.F.; SANTOS, G.M.G. In: **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina-PR. **Anais...**, 2008. p. 6-14.

SHEMESH, M.; HANSEL, W. Stimulation of prostaglandin synthesis in bovine ovarian tissue by arachidonic acid and luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.13, p.448-452, 1975.

SOUZA, C. J. H.; MORAES J. C. F. **Manual de sincronização de cios em ovinos e bovinos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Pecuária Sul, v.13. 1998.

STARBUCK, G. R.; DARWASH, A. O.; LAMMING, G. E.. The importance of progesterone during early pregnancy in the dairy cow. **Cattle Practice,** v. 7, 397–399, 1999.

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

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.1212–24, 2005.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARI S, M.; BARTOLOME; J.A.; SANTOS, J.E.P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 243-254, 2002.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary. Research**, v. 62, p. 314-316, 1998.

TRIMBERGER, G. W.; HANSEL, W. Conception rate and ovarian function following estrus control by progesterone injections in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 14, p. 224-232, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M.; MENEGHETTI, M. Sincronização de ovulação como estratégia para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas, em larga escala In: **V Simpósio de Produção de Gado de Corte e I Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte**, 2006, Viçosa-MG. **Anais...**, 2006, p.529-541.

XIAO, C. W.; GOFF, A. K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. Journal of*.* **Reproduction.and Fertility***,* v.115, p.101-9, 1999.

WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; MCDANIEL, B. T.; MCALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds**. Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 244-251. 2002.

WETTEMANN, R. P.; HAPS, H. D.; EDGERTON, L. A.; SWANSON, L. V. Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 6, p. 1020-1024, 1972.

WILLIAMS, W. F. Excretion of progesterone and its metabolites in milk, urine, and feces. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p.1541-1542, 1962.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. et al. A dairy cow body condition system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, vol.65, n.3, p.495-501, 1982.

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

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism**. Theriogenology**, v. 65, p. 17-29. 2006.

WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R.; FRICKE, P.M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J.N.; GIBBONS, J.R.; GINTHER, O.J. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND**,** 15, 1996, Oregon. **Proceedings...**Oregon: American Embryo Transfer Association, 1996. p. 23-44.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; LOPEZ, H.; HAUGHIAN, J. M.; FRICKE P. M.; GÜMEN, A. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 32, 2001.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. Reproduction and Fertility Device, v. 24, p. 238–243, 2011.

WILTBANK, J. N.; ZIMMERMAN, D. R.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Use of progestational compounds alone or in combinations with estrogen for synchronization. Journal of Animal Science, v. 24, n. 4, p. 990-994, 1965.