LISBEK CRUZ LUGO

**Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação
na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino**

São Paulo

2018

LISBEK CRUZ LUGO

**Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação
na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino**

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2018

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3651
FMVZ

Lugo, Lisbek Cruz
Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação na taxa de prenhez de
receptoras de embrião bovino / Lisbek Cruz Lugo. – 2018.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Progesterona. 2. Receptoras. 3. Transferência de embriões. 4. Concepção. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino", protocolada sob o CEUA nº 7547311016, sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Lisbek Cruz Lugo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/05/2018.

We certify that the proposal "Effect of a single injection of long-acting progesterone on the recipients of pregnancy rate of cattle embryo", utilizing 630 Bovines (630 females), protocol number CEUA 7547311016, under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Lisbek Cruz Lugo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/03/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **03/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 10 anos**

N: **630**

Linhagem: **Bos indicus**

Peso: **450 a 750 kg**

Resumo: A técnica de transferência de embriões tem sido amplamente estudada, porém ainda apresenta dificuldades para a manutenção e condução da gestação a termo. Neste contexto, receptoras de embrião, as quais recebem o produto final da produção in vitro de embriões, são responsáveis pela concepção e darão vida aos exemplares de uma técnica altamente sofisticada. Elas exercem uma das principais funções de todo o processo, a de gestar o embrião de um animal de alto potencial genético. Apesar dos avanços tecnológicos, a perda embrionária permanece alta, resultando em reduzidas taxas de prenhez. Estudos prévios, demonstraram benefícios da utilização de progesterona injetável de longa ação (P4 LA) em protocolos de IATF (Pugliesi et al. (2016). A progesterona (P4) apresenta um papel importante nos processos de estabelecimento e manutenção de gestação em gado bovino. A utilização deste hormônio em momentos estratégicos durante programas de sincronização da ovulação pode resultar em aumento no sucesso da gestação. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo é avaliar o uso da P4 LA após a ovulação sincronizada em receptoras de embriões in vitro resultará em incremento na taxa de prenhez. Para tanto, dois experimentos serão realizados. Experimento 1, um grupo de 60 vacas deverão receber um protocolo hormonal para a sincronização da ovulação. No dia -10, as vacas receberão um dispositivo intravaginal de P4 e a administração de 2mg de benzoato de estradiol (BE); no dia -2 se realizará a retirada do dispositivo de P4 e a administração de 0,530mg de cloprostenol sódico (PGF); no dia -1 se administrará 1mg de BE; o dia 0 será considerado o dia do cio. Em seguida, os animais serão aleatoriamente distribuídos em um de 3 grupos experimentais: Grupo 1 Controle (n=20), fêmeas não receberão tratamento com progesterona de longa ação; Grupo 2 (n=20) as receptoras receberão uma única aplicação com 150 mg de P4 LA i.m. no dia no dia 7 após o cio; Grupo 3 (n=20) as receptoras receberão uma única aplicação com 150 mg de P4 LA i.m. no dia 7 após o cio. Amostras de sangue serão coletadas do dia 4 ao dia 20 pós ovulação para análise dos níveis de P4 sérica. Exame ultrassonográfico dos ovários (Ultrassom M5 Vet, Mindray, mode Color Doppler), para avaliação do desenvolvimento do CL, a cada 24 horas até o dia 10; a partir do dia 10, a coleta de sangue e a ultrassonografia serão a cada 48 horas até o dia 20. No experimento 2 será avaliada a influência do tratamento com de progesterona P4LA em distintos momentos sobre a taxa de prenhez de receptoras de embrião in vitro (Bos indicus). Um grupo de 600 animais receberão o mesmo protocolo hormonal para sincronização da ovulação utilizado no experimento 1. Em sequência, os animais serão aleatoriamente distribuídos em um de 3 grupos experimentais: Grupo 1 Controle (n=200), no dia 7 após a ovulação, as fêmeas que responderem ao protocolo de sincronização receberão um embrião produzido in vitro. No grupo 2 (n=200), no dia 4 as receptoras receberão o tratamento com 150mg P4 LA i.m. e receberão um embrião fertilizado in vitro no dia 7. No grupo 3 (n=200), as receptoras que responderem ao protocolo de sincronização receberão o embrião e o tratamento com 150mg de P4LA i.m. no momento da transferência. Em todos os grupos os diagnósticos de gestação ocorrerão nos dias 30 e 60. Espera-se que a administração de P4 LA em diferentes momentos (dia 4 e dia 7) após a ovulação tem efeito positivo na taxa de concepção de receptoras de embriões FIV. Palavras-chave: P4, Receptoras, Transferência de embriões, Concepção

Local do experimento: Fazendas comerciais localizadas na República Dominicana

São Paulo, 04 de maio de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LUGO, Lisbek Cruz

Título: **Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino**

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: _____

DEDICO

Aos meus pais ☐ Angel De Jesus Cruz Lopez e Rosemary Del Carmen Lugo Corona. Por serem meus maiores exemplos de vida. ☐ Por todo amor, carinho, apoio incondicional, que foi de mais, e todo sacrifício que fizeram para me proporcionar sempre o melhor no Brasil e em toda a vida. Não tenho palavras para expressar meu amor por vocês e minha gratidão por vocês! Muito obrigado por tudo. Eu vou fazer vocês se sentirem orgulhosos!

AGRADEÇO

À Deus, por me dar forças para seguir em frente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Angel De Jesus Cruz Lopez e Rosemary Del Carmen Lugo Corona, por me apoiaram nessa jornada, que foi uma superação pessoal e acadêmica. Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

Ao meu irmão, Angel Paul Cruz Lugo, por acreditar, compreender e me apoiar em todos os momentos.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Edgar Máximo Tineo Flores, pela paciência, carinho e amor nas horas mais difíceis. Obrigada pela compreensão e por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me encorajando. Obrigada, amor!

Ao Prof. Pietro, meu exemplo a seguir. Obrigada pela paciência (eu sei que não foi nada fácil), pela confiança que o senhor teve, pelos ensinamentos e por todo o apoio desde o começo! Vou levar seus conselhos e ensinamentos para a vida toda! Serei sempre grata, professor! Muito obrigada!

À empresa EmbrioDom por acreditar no projeto e fornecer todos os subsídios necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do departamento Rômulo (El Flaco), Rodolfo (Bada), Marcos (Colli) e Flávia (Flavaa) pelo carinho, amizade e por sempre me tratarem tão bem! Sou muito grata à vocês! Aos novos amigos Guilherme (Gaúcho), Walter (Tuba), Bernado (Bê), Lais, Laisa (Chica), e por último à Angela, que foi um apoio incondicional. E a todos outros amigos do VRA que de alguma maneira fizeram parte desta caminhada!

À querida Harumi, por todo apoio durante esse tempo no VRA.

À Universidade de São Paulo por ter me acolhido nessa etapa fundamental da

minha carreira.

Aos Professores do VRA-FMVZ/USP, pelas disciplinas ministradas e pelo aprendizado.

Às empresas parceiras, Ourofino Agronegócio e Inovare Biotecnologia e Saúde Animal, pelo fornecimento dos hormônios utilizados no estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro durante a fase do mestrado.

E por fim, agradeço às queridas vacas Nelore e mestiças do meu estudo. Devo respeito à vocês.

RESUMO

LUGO, L. C. **Efeito do tratamento com progesterona injetável de longa ação na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino.** [Effect of long acting progesterone on pregnancy rate in cattle embryo recipients]. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As receptoras de embriões bovinos devem possuir um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do embrião, estabelecimento da gestação e nascimento de um bezerro saudável. Apesar dos avanços tecnológicos, a perda embrionária ainda permanece elevada, resultando em taxas de prenhez reduzidas após a transferência de embriões (TE). A progesterona (P4) apresenta papel importante nos processos de estabelecimento e manutenção de gestação em fêmeas bovinas. Diversos estudos evidenciaram que o tratamento com P4 injetável de longa ação (P4LA) após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) pode favorecer o estabelecimento da gestação e aumentar as taxas de concepção. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar se o tratamento com P4LA após a ovulação sincronizada em receptoras de embriões produzidos *in vitro* (PIV) resultará em aumento na concentração de P4 e na taxa de prenhez, sem comprometer o desenvolvimento do corpo lúteo (CL). Para isso, o presente estudo foi dividido em dois experimentos. O Experimento 1 foi realizado no Brasil com 41 vacas *Bos indicus* (Nelore) tratadas com um dispositivo intravaginal de P4 e 2 mg de benzoato de estradiol (BE) i.m. no D-10. No D-2, o dispositivo foi removido e as vacas receberam 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF). No D-1, foi administrado 1 mg de BE para a indução da ovulação. Das 41 vacas, 36 (87,8%) ovularam e foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais: Controle (n = 13), sem tratamento adicional; P4D4 (n = 11), administração de 150 mg de P4LA i.m. no D4; e P4D7 (n = 12), administração de 150 mg de P4LA i.m. no D7. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas Color Doppler para verificar a perfusão do CL e colheitas de sangue para análise da concentração de P4 do D4 ao D7 a cada 24 h e do D7 ao D25 a cada 48 h. Verificou-se interação tratamento*tempo (P = 0,004) para concentração plasmática de P4, com aumento transitório na concentração de P4 24h após a administração de P4LA no D4 e D7. Entretanto,

não ocorreu interação tratamento*tempo para o diâmetro do CL ($P = 0,59$) e tampouco efeito dos tratamentos no fluxo sanguíneo central (FSC; $P = 0,97$) e periférico (FSP) do CL ($P = 0,97$). No experimento 2, o mesmo protocolo de sincronização descrito no experimento 1 foi empregado em 787 receptoras mestiças sincronizadas para TE na República Dominicana. Destas, 69,9% apresentaram CL > 14 mm no D4 e foram distribuídas aleatoriamente nos 3 grupos experimentais: Controle ($n = 168$), P4D4 ($n = 201$) e P4D7 ($n = 181$). A TE de embrião PIV foi realizada no D7 e o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia no D30 e D60. A taxa de concepção aos 30 dias [Controle: 41,4% (70/168); P4D4: 42,3% (89/201); P4D7: 41,2% (80/181); $P = 0,41$], aos 60 dias [Controle: 36,3% (61/168); P4D4: 39,8% (80/201); P4D7: 38,1% (69/181); $P = 0,49$] e a perda gestacional [Controle: 5,4% (9/168); P4D4: 4,5% (9/201); P4D7: 6,1% (11/181); $P = 0,73$] não diferiram entre os tratamentos. Em conclusão, apesar do aumento da concentração plasmática de P4 após os tratamentos com P4LA no D4 ou D7, não foi observado efeito positivo desses tratamentos na taxa de prenhez e na perda gestacional de receptoras de embriões bovinos. Além disso, os tratamentos com P4LA não comprometeram o desenvolvimento do CL.

Palavras-chave: Progesterona, Receptoras, Transferência de embriões, Concepção

ABSTRACT

LUGO, L. C. Effect of treatment with long-acting injectable progesterone on the pregnancy rate in cattle embryo recipients. 2018. 73 f. Dissertation (Masters in Sciences) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The recipients of bovine embryos must have a suitable uterine environment for embryo development, establishment of gestation and birth of a healthy calf. Despite technological advances, embryo loss remains high, resulting in reduced pregnancy rates after embryo transfer (ET). Progesterone (P4) plays an important role in the processes of establishing and maintaining gestation in bovine females. Several studies have shown that treatment with long-acting injectable progesterone (P4LA) after timed artificial insemination (TAI) can help the establishment of pregnancy and increase conception rates. Thus, the aim of the present study was to verify whether treatment with P4LA after synchronized ovulation in recipients of *in vitro* produced (IVP) embryos would increase P4 plasmatic concentration and pregnancy rate, without interfering with the development of corpus luteum (CL). The study was divided in two experiments. Experiment 1 was conducted in Brazil with 41 *Bos indicus* cows (Nelore) synchronized with a P4 intravaginal device and 2 mg of estradiol benzoate (EB) i.m. on D-10. On D-2, the device was removed and cows received 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 0.530 mg of sodium Cloprostenol (PGF) i.m. On D-1, 1 mg of EB was administered to induce ovulation. From the 41 cows, 36 (87.8%) ovulated and were randomly distributed in three experimental groups: Control (n = 13), without any additional treatment; P4D4 (n = 11) administration of 150 mg of P4LA i.m. on D4; and P4D7 (n = 12), administration of 150 mg of P4LA i.m. on D7. The CL blood flow was evaluated using Color Doppler ultrasonography and blood sampling was collected for analysis of P4 concentration from D4 to D7 every 24 h and from D7 to D25 every 48 h. Interaction Treatment*Time (P = 0.004) was found for plasma P4 concentration, with a transient increase of P4 concentration 24h after treatments with P4LA on D4 and D7. However, there was neither an interaction Treatment*Time for CL diameter (P = 0.59), nor an effect of CL central (P = 0.97)

and peripheral blood flow ($P = 0.97$). In experiment 2, the same synchronization protocol described in experiment 1 was used in 787 recipients synchronized for ET in Dominican Republic. From those, 69.9% had CL > 14 mm on D4 and were randomly assigned to the following experimental groups: Control ($n = 168$), P4D4 ($n = 201$), and P4D7 ($n = 181$). The IVP embryos were transferred on D7 and the gestation diagnosis was performed on D30 and D60 by ultrasonography. The conception rate at 30 days [Control: 41.4% (70/168); P4D4: 42.3% (89/201); P4D7: 41.2% (80/181); $P = 0.41$] at 60 days [Control: 36.3% (61/168); P4D4: 39.8% (80/201); P4D7: 38.1% (69/181); $P = 0.49$] and gestational loss [Control: 5.4% (9/168); P4D4: 4.5% (9/201); P4D7: 6.1% (11/181); $P = 0.73$] did not differ between treatments. In conclusion, despite the increase in plasma P4 concentration after treatment with P4LA on D4 and D7, no positive effect of using P4LA was observed on conception rate and gestational loss of bovine embryo recipients. In addition, P4LA treatments did not compromise the development of CL.

Key words: Progesterone, Recipients, Embryo transfer, Conception

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho hipotético gráfico da resposta de receptoras de embriões ao tratamento com 150 mg de progesterona injetável de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....33

Figura 2. Desenho esquemático do delineamento do Experimento 1: estudo da concentração plasmática de progesterona (P4) em vacas dos grupos Controle (sem tratamento adicional), P4D4 (administração de 150 mg de P4 de longa ação - P4LA - i.m quatro dias após a ovulação presumida) e P4D7 (administração de 150 mg de P4LA i.m sete dias após a ovulação presumida). As vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4 e 2mg de benzoato de estradiol (BE) - 8 dias - 300 UI de gonadotrofina crônica quina (eCG) e 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF) – 1 dia - 1 mg de BE - 1 dia – ovulação presumida (D0).....36

Figura 3. Desenho esquemático do delineamento do Experimento 2: avaliação do efeito do tratamento com progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos.....40

Figura 4. Concentração plasmática de progesterona (P4) durante o ciclo estral de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) após o tratamento com 150 mg de P4 de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....46

Figura 5. Diâmetro do corpo lúteo durante o ciclo estral de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) após o tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....47

Figura 6. Fluxo sanguíneo central (FSC) do corpo lúteo (CL) de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....48

Figura 7. Fluxo sanguíneo periférico (FSP) do corpo lúteo (CL) de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....49

Figura 8. Efeito do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 30 dias de receptoras de embrião.....50

Figura 9. Efeito do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 60 dias de receptoras de embrião.....51

Figura 10. Perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.....51

Figura 11. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs > 18 mm) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a taxa de concepção aos 30 dias de gestação de receptoras de embrião.....52

Figura 12. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs > 18 mm) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a taxa de concepção aos 60

dias de gestação de receptoras de embrião.....53

Figura 13. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18 \text{ mm}$ vs $\geq 18 \text{ mm}$) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embrião.....53

Figura 14. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18 \text{ mm}$ vs $> 18 \text{ mm}$) e do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 30 dias de gestação em receptoras de embrião..... 54

Figura 15. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18\text{mm}$ vs $> 18\text{mm}$) e do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 60 dias de gestação em receptoras de embrião.....55

Figura 16. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18\text{mm}$ vs $\geq 18\text{mm}$) e do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embrião.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da funcionalidade do corpo lúteo (CL) de acordo com o fluxo sanguíneo central (FSC) e periférico (FSP) obtidos por imagens ultrassonográficas em modo Color Doppler	38
---	----

Sumário

RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Transferência de embriões.....	23
2.2. Importância da receptora nos programas de TE	24
2.3. Manutenção da gestação.....	25
2.4. A Progesterona.....	27
2.4.1. Usos de eCG, GnRH, LH, hCG e P4 na reprodução.....	28
2.4.2. Uso de dispositivos com P4	29
2.4.3. Usos de P4 injetável na reprodução	30
3. HIPÓTESES.....	32
3.1. Desenho hipotético Gráfico.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo geral	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1. Experimento 1.....	35
5.1.1. Animais e local do experimento.....	35
5.1.2. Protocolo de sincronização da ovulação e tratamento com P4LA ..	35
5.1.3. Tratamento com P4LA	36
5.1.4. Coleta de sangue para dosagem de P4	36
5.1.5. Avaliação por ultrassonografia Color Doppler	37
5.2. Experimento 2.....	39
5.2.1. Animais e local	39
5.2.2. Protocolo de sincronização da ovulação para TETF e tratamento com P4LA.....	39
5.2.3 Avaliações ultrassonográficas.....	40
5.2.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	40
5.2.5. Transferência dos embriões.....	42
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6.1. Experimento 1.....	43
6.2. Experimento 2.....	44
7. RESULTADOS.....	45
7.1. Experimento 1.....	45

7.2. Experimento 2:	50
8. DISCUSSÃO	56
9. CONCLUSÃO	59
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado da população mundial tem como consequência a necessidade de aumentar o abastecimento de alimentos de produtos de origem animal para a população. A população mundial atual está ao redor de 7,3 bilhões de pessoas (FAOSTAT, 2015), o que nos leva a pensar na necessidade de criar alternativas rápidas e eficientes para alimentar o planeta. Por outro lado, a população mundial de bovinos conta com aproximadamente 1,48 bilhões de animais (FAOSTAT, 2014), sendo a América detentora de 35,4 % do total destes animais, o que equivale a 487 milhões de cabeças (FAOSTAT, 2014). No Brasil, o rebanho bovino totaliza aproximadamente 212 milhões de cabeças (FAOSTAT, 2014), com produção de cerca de 9,6 milhões de toneladas de carne bovina por ano (FAOSTAT, 2013). Já a República Dominicana possui 3 milhões de bovinos e produz ao redor de 100 mil toneladas de carne bovina por ano (FAOSTAT, 2014).

A reprodução animal se destaca como um dos pontos chave para o incremento das populações e permite um aumento da produtividade dos sistemas de produção de carne e leite. As biotecnologias da reprodução, como inseminação artificial em tempo fixo (IATF), coleta de embriões (*flushing*), transferência de embriões em tempo fixo (TETF), aspiração folicular intravaginal guiada por ultrassom (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) são importantes ferramentas que auxiliam na multiplicação rápida de animais geneticamente superiores, em comparação com a monta natural e, conseqüentemente, melhoram a produção de gado em quantidade e qualidade para gerações futuras (VIEIRA, 2013).

A transferência de embriões (TE) é a biotecnologia mais utilizada nos rebanhos bovinos após a inseminação artificial (IA) (COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010). Nos últimos anos houve um crescimento do uso da TE e, somente em 2016, foram coletados 918.264 embriões e transferidos 660.221 embriões em todo o mundo (IETS, 2016). Atualmente, a TETF pode ser considerada a biotecnologia que possibilita o maior ganho genético nos rebanhos (BARUSELLI et al., 2010). Neste contexto os programas de TETF são importantes para a multiplicação de fêmeas geneticamente superiores,

aumentando a produtividade e acelerando a disseminação da genética desejável pelo aumento do número de descendentes obtidos de doadoras com alto valor genético e pela melhora da eficiência reprodutiva (BARUSELLI et al., 2010). No entanto, o sucesso dos programas de TE depende de uma série de fatores como a qualidade do embrião, das receptoras e da sua interação (HASLER, 2003).

Com relação às receptoras de embrião, tanto fêmeas de raça pura quanto provenientes de cruzamentos podem ser utilizadas. No entanto, existem diversos estudos que demonstram diferenças importantes entre as fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, tanto na fisiologia como na reprodução (NASSER et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; SANTOS et al., 2014; BATISTA et al., 2017). Grande parte dos estudos reportados na literatura foram feitos com animais *Bos taurus* como modelo experimental. Há também um número crescente de estudos que empregam raças *Bos indicus*, como Brahman e Nelore, no estudo da fisiologia ovariana (SARTORI; BARROS, 2011). No entanto, não se tem muita informação sobre o desenvolvimento embrionário e taxas de prenhez em receptoras mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) e acredita-se que este cruzamento possa ter efeito na eficiência dos programas de sincronização dessas receptoras de embriões (BARUSELLI et al., 2006).

O estabelecimento e manutenção da gestação envolvem complexa interação entre o embrião, o ambiente uterino e o corpo lúteo (CL) (MANN; LAMMING, 1995). As taxas de concepção de embriões oriundos de superovulação de doadoras (SOV) ou fertilização *in vitro* (FIV) são menores que as obtidas por IA ou monta natural (PETERSON; LEE, 2003). Tais resultados podem estar associados ao subdesenvolvimento dos embriões, à assincronia útero-embrião e à má qualidade do CL das receptoras (SREENAN; DISKIN, 1987), o que resulta em falhas no reconhecimento materno e manutenção da gestação.

Uma possível estratégia para transpor este problema é a suplementação com progesterona (P4) nas receptoras de embrião (SOUZA, 2015). A P4 é um hormônio esteroide, produzido pelo CL, com inúmeras funções biológicas, principalmente relacionadas aos eventos reprodutivos. A P4 é imprescindível para a estimulação das atividades secretoras do oviduto e das glândulas endometriais, sendo peça chave no estabelecimento da gestação, no desenvolvimento do embrião e na manutenção da gestação (BARNWELL et al.,

2015). Dessa forma, elevadas concentrações de P4 circulante em vacas, principalmente no início da gestação, estão associadas com maiores taxas de prenhez e de crescimento embrionário (NIEMANN; SACHER; ELSAESSER, 1985; LONERGAN et al., 2007). Nesse contexto, Mann et al. (1999) observaram aumento significativo na concentração sanguínea de P4 do dia 6 ao 15 após IA em vacas gestantes em comparação à vacas não gestantes.

Em estudo com embriões provenientes de PIVE ou SOV foi observado que o efeito da P4 sobre o desenvolvimento do concepto é mediado pelo endométrio (CLEMENTE et al., 2009). Esse fato foi evidenciado visto que a adição de P4 ao meio de cultura dos embriões *in vitro* não teve efeito sobre a taxa de conversão à blastocisto (CLEMENTE et al., 2009; LARSON; KRISHER; LAMB, 2011), mas elevadas concentrações de P4 *in vivo* antes da TE resultaram em aumento significativo no comprimento do concepto no dia 14 da gestação. Assim, foi demonstrando que o efeito positivo das elevadas concentrações de P4 não se deve a um efeito direto no embrião, mas sim à alterações induzidas pela P4 no ambiente uterino em que o embrião está se desenvolvendo (CLEMENTE et al., 2009). Outros estudos corroboram esta achados (CARTER et al., 2008; FORDE et al., 2009; O'HARA et al., 2014). Entretanto, existem relatos de que o aumento das concentrações de P4 no início do ciclo estral (2 ou 3 dias) podem afetar criticamente a função do CL durante o seu desenvolvimento (PUGLIESI et al., 2014) e até mesmo levar a luteólise precoce e perda gestacional (GINTHER, 1970; MACMILLAN; PETERSON, 1993; BURKE et al., 1994; VAN CLEEFF et al., 1996).

Durante os últimos anos, pesquisadores fizeram muito progresso na elucidação dos efeitos benéficos relacionados ao aumento da concentração de P4 no diestro e o estabelecimento da gestação em bovinos (LONERGAN; FORDE, 2014). No entanto, ainda não está bem estabelecido se o uso de P4 no início da fase lúteínica de receptoras de embriões bovinos pode comprometer o desenvolvimento e funcionalidade do CL afetando o estabelecimento da gestação ou melhorar o desenvolvimento embrionário e, consequentemente, aumentar taxa de prenhez após a TE. Portanto o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de P4 de longa ação (P4LA) em diferentes momentos do ciclo estral na fase lútea inicial (D4 e D7 após a ovulação) no perfil plasmático de P4, no desenvolvimento do CL e na taxa de

prenhez de receptoras de embrião bovino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transferência de embriões

A TE é uma biotecnologia da reprodução que tem como objetivo transferir embriões em fase inicial de desenvolvimento (5-8 dias) para o útero de receptoras compatíveis a esta fase gestacional. As receptoras são fêmeas fisiologicamente preparadas para receberem um embrião de outra fêmea (doadora) da mesma espécie (VIERA et al., 2013). Inicialmente a TE de embriões produzidos *in vivo*, (SOV – flushing) foi amplamente utilizada em todo o mundo, seguida posteriormente pela PIVE em gado bovino (THIBIER, 2005).

É fato que a ferramenta de IA apresenta custos de aplicação mais acessível em relação à TE, entretanto com menor ganho genético. A TE acelera o ganho genético por maximizar o número de descendentes obtidos de fêmeas geneticamente superiores (doadoras de oócitos e de embriões) e pode colaborar sobremaneira com os programas de melhoramento genético. Outra finalidade da TE é a de conservação de genes de espécies / raças que se encontram ameaçadas de extinção. O desenvolvimento de protocolos eficientes, como por exemplo os que envolvem congelação-descongelação de embriões, pode colaborar de forma segura em termos sanitários para o intercâmbio de animais geneticamente superiores, com a possibilidades de expansões entre regiões e continentes (HASLER, 2003; THIBIER, 2005).

Graças às técnicas de SOV, PIVE e TE aumentou-se a possibilidade de multiplicação de uma matriz geneticamente superior durante todo o ano. Com estas técnicas é possível aumentar a taxa de melhoramento genético de um rebanho (VIEIRA, 2013). No entanto, é importante ressaltar que existem vários fatores que podem interferir no sucesso do desenvolvimento de uma gestação em programas de TE em bovinos (LOONEY et al., 1981, 2006; HASLER, 2003; BELTMAN et al., 2009; BÓ; TRÍBULO; MAPLETOFT, 2012; MARTINS et al., 2012). Dentre estes fatores, problemas relativos a questões como genética, nutrição e manejo sanitário podem influenciar no estabelecimento de um mecanismo adequado de desenvolvimento do complexo processo da

comunicação materno-embrionária. Outro fator que deve ser destacado é a exposição aos esteroides (estrógeno e P4) ovarianos durante as fases pré- e pós-ovulatória na eficiência do processo de TE (RODRIGUES et al., 2010). Assim, as receptoras de embriões desempenham um papel fundamental no sucesso dos programas de TE.

2.2. Importância da receptora nos programas de TE

As receptoras são parte fundamental dos programas de TE, pois são encarregadas de levar a gestação de embriões de alto valor genético a termo. A obtenção de receptoras para os programas de TE é um tema que merece atenção e, por isso, é fundamental uma avaliação criteriosa dessas fêmeas. Nesse contexto, é importante que sejam utilizadas apenas receptoras que tenham o histórico reprodutivo individual e sem enfermidades diagnosticadas (BAYARD et al., 2008). Dessa forma, os resultados de TE podem ser otimizados.

Ainda, é necessário que haja sincronização do estágio do embrião produzido *in vivo* ou *in vitro* e do momento do ciclo estral das receptoras (sincronização doadora-receptora). Nesse aspecto, as receptoras podem ser utilizadas com base na observação de estro ou serem sincronizadas para receberem a transferência de embrião em tempo fixo (TETF) (BÓ et al., 2002; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2010, 2011). No entanto, tem-se observado elevados custos de manutenção das receptoras associados à baixa eficiência dos programas tradicionais baseados no tratamento com análogo da prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) para sincronizar e observar o estro, uma vez que a detecção eficiente do estro da receptora é fator limitante para a ampla aplicação no sucesso dessa tecnologia (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Assim, o uso da TETF se mostra como uma eficiente ferramenta para otimizar o uso das receptoras.

Existem ainda problemas na manutenção da gestação das receptoras. Sabe-se, por exemplo, que a concentração sanguínea de P4 influencia positivamente na manutenção da gestação, oferecendo um desenvolvimento adequado ao embrião. Foi comprovando cientificamente melhora na taxa de concepção e crescimento embrionário em fêmeas bovinas que apresentam altas

concentrações séricas de P4, em comparação com às que apresentam menores concentrações de P4 no início da gestação (NIEMANN; SACHER; ELSAESSER, 1985; MANN et al., 1999; LONERGAN et al., 2007).

Além disso, estima-se que em bovinos cerca de 40% da perda de concepção ocorra no início da gestação (entre os dias 8 a 16, considerando-se o dia 0 como o dia da ovulação) (HUGENTOBLE et al., 2010). De fato, em outros estudos prévios foi relatada maior taxa de perda de gestação (70% a 80%) nas primeiras três semanas de gestação, particularmente durante o período em que ocorre o reconhecimento materno da gestação (SREENAN; DISKIN, 1987; DISKIN; KENNY, 2014). Nesse estágio da gestação o CL é a principal fonte de P4. Assim, receptoras de embrião com comprometimento no desenvolvimento do CL podem apresentar menor eficiência na produção de P4 e na manutenção da gestação (BARUSELLI et al., 2010).

2.3. Manutenção da gestação

A comunicação materno-fetal é vital para o sucesso do estabelecimento e manutenção da gestação. Embora bastante estudada, há ainda uma lacuna de conhecimento sobre muitos dos mecanismos e sobre a natureza dos sinais que o conceito produz e são responsáveis por essa conversa cruzada entre conceito e endométrio.

Uma vez que a fertilização ocorre, o embrião bovino caminha pelo oviduto até aproximadamente o quarto dia da gestação, quando possui cerca de 16 células. A partir deste momento, o embrião passa ao interior do útero e ao redor do sétimo dia de gestação já se encontra no estágio de blastocisto, sendo composto pela massa celular interna (que irá crescer para formar o feto) e pelo trofotoderma (que formará a placenta). Nos dias 9-10 pós-fertilização, o blastocisto eclode, rompendo a zona pelúcida (ZP), e começa o processo de alongamento, que envolve a transição de sua forma esférica (D7 da gestação), para a forma ovóide (D12-13), tubular (D14-15) e, finalmente, filamentosa (D16-17) (DEGRELLE et al., 2005). Durante o alongamento, o conceito tem um incremento de mais de mil vezes em seu tamanho, especialmente devido à expansão do trofotoderma (BETTERIDGE et al., 1980), associado um aumento

do conteúdo de proteínas (MORRIS; DISKIN; SREENAN, 2000). Após o D19, o conceito alongado inicia o processo de implantação, com firme aposição e fixação do trofotoderma ao epitélio do lúmen endometrial. A adequada comunicação entre o conceito, o endométrio e o CL é vital para o estabelecimento da gestação (RIZOS et al., 2017). A síntese de P4 pelo CL atua indiretamente via endométrio para estimular o crescimento embrionário (FORDE et al., 2009; SPENCER; FORDE; LONERGAN, 2016). Com o alongamento, o conceito passa a produzir interferon- τ (IFN- τ) pelas células do trofotoderma (ROBERTS et al., 1999; SPENCER; BAZER, 2004; ROBINSON et al., 2008), o que em bovinos é o sinal chave para o reconhecimento materno da gestação (SPENCER; BAZER, 2004). De forma mais detalhada, durante o processo do reconhecimento materno da gestação, as células mononucleadas do trofotoderma do conceito sintetizam e secretam IFNT entre os D10 e D21-25, com máxima produção no D14-16 (BAZER, 1992; ROBERTS et al., 1999).

A comunicação sub-ótima entre o conceito, o endométrio e o CL, resultante do comprometimento do desenvolvimento do conceito e / ou da receptividade uterina anormal, contribui para uma alta incidência de mortalidade embrionária (MAMO; RIZOS; LONERGAN, 2012). Nesse contexto, tem sido bem descrito na literatura a ocorrência de uma alta taxa de perda gestacional em bovinos após a fertilização (DISKIN; MORRIS, 2008; DISKIN; PARR; MORRIS, 2012), sendo que a maioria dessas ocorre no início na gestação, antes mesmo do reconhecimento materno da gestação ocorrer, o que dá por volta do 16º dia após a concepção (DISKIN; MORRIS, 2008). Outros autores concordam que essa comunicação já seja estabelecida durante os primeiros quatro dias após a fertilização (MAILLO et al., 2016). Fato é que nas primeiras três semanas de gestação podem ocorrer 70 a 80% de perdas gestacionais. Embora as causas potenciais sejam multifatoriais e possam estar ligadas a vários fatores ao longo do eixo de desenvolvimento (LONERGAN, 2009; RIZOS et al., 2010), a mortalidade embrionária precoce é o principal fator contribuinte para o declínio da eficiência reprodutiva (DISKIN; MORRIS, 2008).

2.4. A Progesterona

Após o pico de hormônio luteinizante (LH) que induz a ovulação, as células da granulosa e da teca iniciam sua diferenciação em células luteínicas. A produção hormonal que antes era de estradiol passa a ser predominantemente de P4. As células luteínicas grandes originam-se das células da granulosa e as células luteínicas pequenas originam-se das células da teca do folículo ovulado (BARROS; DI STACI, 2012). A P4 está relacionada a vários efeitos fisiológicos, dentre eles a diminuição da frequência dos pulsos de GnRH pela retroalimentação negativa no hipotálamo, o crescimento e o aumento das secreções endometriais, além de atuar nas glândulas endocervicais (BARROS; DI STACI, 2012). A P4 pode ser também sintetizada por outros tecidos além do ovariano (CL), como a placenta e a região cortical das glândulas suprarrenais. Esse esteroide é metabolizado pelo fígado e excretado pela urina e fezes (BARROS; DI STACI, 2012).

O uso da P4 na reprodução tem evoluído com o passar dos anos. Foi verificado que a concentração plasmática de P4 de uma vaca em condições fisiológicas de normalidade tem uma variação de 1 a 6 ng/ml no dia 7 do ciclo estral, com média de 3,21 ng/ml (NIEMANN et al., 1985). É importante destacar que vacas que possuem concentrações de P4 sérica menor que 5 ng/ml no dia 14 do ciclo estral são mais propensas a perdas gestacionais (MAURER et al., 1983), detectadas entre os dias 28 e 42 (KENYON et al., 2013). Esta informação demonstra a importância da concentração de P4 no início do ciclo estral para a manutenção da gestação.

O momento em que ocorre o aumento da concentração de P4 na fase lútea inicial afeta o momento em que ocorrerá o *downregulation* dos seus receptores no epitélio luminal e glandular, o que parece ser um ponto crítico para o estabelecimento da gestação (OKUMU et al., 2010; BAZER et al., 2011). A suplementação com P4 feita na fase lúteínica inicial tem gerado diferentes resultados em termos de taxa de sobrevivência gestacional tanto em vacas como em novilhas. Por exemplo, a administração de P4 exógena em vacas de corte nos dias 1-4 pós-IA melhorou o alongamento do conceito no dia 14 (GARRETT

et al., 1988b, 1988a). Ainda, em outros estudos, quando a suplementação com P4 foi realizada na fase luteal, foi também observado aumento na taxa de prenhez em vacas de leite (ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989; MANN et al., 2001; LARSON; BUTLER; CURRIE, 2007). No entanto, em outros estudos foi relatado um impacto negativo da suplementação com P4 em novilhas (VAN CLEEFF; DROST; THATCHER, 1991; LYNCH; MACMILLAN; TAUFA, 1999) e redução da taxa de prenhez em vacas Holandesas suplementadas com P4 nos dias 4-9 (PARR et al., 2014).

A inconsistência de resultados observada entre os estudos supracitados, pode ser consequência das diferentes concentrações de P4 endógena nos animais no momento da suplementação exógena com P4, uma vez que há evidências sobre uma relação linear e quadrática entre P4 e taxa de prenhez, com uma suave redução da taxa de prenhez quando há concentrações muito elevadas de P4 (STRONGE et al., 2005; PARR et al., 2012). Uma hipótese alternativa que pode ser montada com base nos dados da literatura disponível é que a administração de P4 em fase muito inicial do ciclo estral possa comprometer a função lútea, levando à luteólise e à perda gestacional (GINTHER, 1970; MACMILLAN; PETERSON, 1993; BURKE et al., 1994; VAN CLEEFF et al., 1996).

Várias estratégias também têm sido utilizadas com objetivo de aumentar as concentrações plasmáticas de P4 durante o período considerado como crítico no que tange o reconhecimento materno da gestação (dias 15 a 19 após a IA) (BINELLI et al., 2001; THATCHER; MOREIRA; PANCARCI, 2002). O uso de P4 exógena, por exemplo, proporciona regulação dos receptores de ocitocina que controlam a liberação PGF pelo endométrio uterino (OKUMU et al., 2010; FORDE et al., 2011). Inúmeros outros estudos apontam o efeito positivo da P4 no desenvolvimento da gestação em bovinos (NISHIGAI et al., 1998; MANN et al., 1999; BINELLI et al., 2001; THATCHER et al., 2001; NASSER et al., 2004).

2.4.1. Usos de eCG, GnRH, LH, hCG e P4 na reprodução

Em estudo conduzido por Marques et al. (2012) foi avaliado o efeito de diferentes tratamentos hormonais (GnRH, hCG, LH e dispositivo intravaginal de P4) no momento da TE, com o objetivo de aumentar as taxas de prenhez de

receptoras de embrião. Os tratamentos têm finalidade de aumentar a concentração circulante de P4 pela indução da formação de CL's acessórios originados pela ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular. Nesse estudo, foi observado aumento na concentração de P4 e na taxa de prenhez das receptoras tratadas quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, outros autores verificaram taxa de prenhez 12,8% mais elevada em receptoras de embriões tratadas com dispositivo intravaginal de com 1,9 g de P4 comparada às não tratadas (MACMILLAN; TAUFA, V; HAYMAN, 1994). Schmitt et al. (1996) também verificaram aumento das concentrações de P4 em animais tratados com hCG. Além disso, a eCG, quando administrada no momento da remoção do dispositivo de P4 (início do pró-estro), aumentou o tamanho do CL e a produção de P4 no diestro subsequente (BARUSELLI et al., 2004; SALES et al., 2008). De maneira geral, os protocolos de IATF com tratamento com eCG no início no pró-estro tendem a melhorar as taxas de ovulação e concepção em bovinos de corte e de leite, principalmente em fêmeas em anestro (MACMILLAN; PETERSON, 1993; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2004).

2.4.2. Uso de dispositivos com P4

No Brasil, estão disponíveis diversos dispositivos intravaginais que liberam P4, além do implante auricular contendo progestágeno. O tratamento com esses dispositivos são frequentemente associados à administração de estrógenos para sincronizar tanto a emergência da onda de crescimento folicular quanto o momento da ovulação, o que permite a realização da IATF e da TETF (BÓ et al., 2002; BARUSELLI et al., 2004; BARROS; DI STACI, 2012).

Além da sua utilização nos protocolos de sincronização de emergência de onda folicular e ovulação, há evidências de outra forma de emprego estratégico dos dispositivos intravaginais de P4 após a ovulação para melhorar o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da gestação. Em um trabalho, utilizou-se dispositivo intravaginal de P4 em receptoras de embrião para aumentar a concentração de P4 no diestro inicial e foi verificado aumento da

concentração de P4 associado ao sucesso gestacional após a TE (KENYON et al., 2013). Mais especificamente, foi relatado que mudanças na concentração de P4 entre os dias 0 a 7 e entre os dias 7 a 14 foram associadas ao sucesso gestacional no dia 63. O aumento de P4 necessário para melhorar o estabelecimento da gestação foi de 2,71 ng/mL para os dias 0-7 e de 1,48 ng/mL para os dias 7 a 14.

Em outro trabalho mais recente, com vacas leiteiras de alta produção, foi estudada a utilização estratégica do dispositivo com 1,55 g de P4 na fase lútea inicial (entre os dias 3 a 5 pós-IA) e no momento do reconhecimento materno da prenhez, ou seja, entre os dias 15 a 17 pós-IA (GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2017). Para tal, no terceiro dia pós-IA as vacas foram distribuídas nos seguintes grupos: controle, sem tratamento (C: n = 351), tratamento com P4 iniciando 3 dias após AI (P4-D3: n = 203) ou tratamento com P4 iniciando 15 dias após a IA (P4-D15: n = 261). As vacas tratadas com P4-D3 tiveram probabilidade 1,7 vezes maior de conceber do que as vacas controle ($P = 0,004$), enquanto as vacas tratadas com P4-D15 apresentaram risco 1,4 vezes maior de prenhez ($P = 0,06$). Diferenças não foram observadas entre os tratamentos com P4. Nas vacas não gestantes, os tratamentos com P4 (D3 vs D15) não tiveram efeito no retorno subsequente ao estro ou no intervalo entre IA e tampouco nas taxas de perda gestacional precoce. Em contraste, nas vacas prenhes, o risco relativo de gestação de gêmeos foi 2,5 vezes maior para aquelas tratadas com P4-D15 ($P = 0,02$) em relação às demais vacas. Assim, esse estudo evidencia a eficácia da suplementação de P4 após a IA. No entanto, quando administrada no momento do reconhecimento da gestação ao invés da fase lútea precoce, esse tratamento aumentou a taxa de gestação gemelar.

2.4.3. Usos de P4 injetável na reprodução

Buscando compreender o desenvolvimento do CL e a função da suplementação com P4LA durante a fase luteínica inicial em vacas Nelore, Pugliesi et al. (2014) observaram que a suplementação com P4LA, quando administrada na dose de 150 ou 300 mg nos dias 2 ou 3 pós-ovulação, resultou em aumento dose-dependente na concentração plasmática de P4 12 h após o

tratamento. Apesar do aumento verificado, as concentrações de P4 diminuíram ligeiramente 24 h após o tratamento (dia 4 ou 5) em todos os grupos tratados com P4. Após esse período, a concentração de P4 manteve-se em níveis semelhantes até o início da luteólise, fato compatível com relatos anteriores (GINTHER et al., 2010; HANNAN et al., 2010). O presente método de suplementação com P4 no dia 3 pós-estro foi eficiente para aumentar as concentrações de P4 circulantes e não sugerem um efeito negativo sobre a função CL durante o seu desenvolvimento. Entretanto, existem relatos de que o aumento das concentrações de P4 no início do ciclo (2 ou 3 dias) estral podem afetar criticamente a função do CL durante o seu desenvolvimento (PUGLIESI et al., 2014) e até mesmo levar a luteólise e perda gestacional (GINTHER, 1970; MACMILLAN; PETERSON, 1993; BURKE et al., 1994; VAN CLEEFF et al., 1996).

A fertilidade de vacas Nelore em anestro tratadas com P4LA no dia 4,5 após ovulação aumentou a taxa de prenhez à IATF (55.6 vs. 46%) (PUGLIESI et al., 2016). Resultados semelhantes foram verificados em vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF. Souza (2015) observou aumento do perfil plasmático de P4 após o tratamento com 900 mg de P4LA três dias após a IATF. As concentrações plasmáticas de P4 se mantiveram acima de 1n/mL ($P = 0,0001$) por 9 dias. Os autores verificaram efeito positivo na taxa de concepção à IATF após o tratamento com P4LA em vacas durante o verão. Tratamento semelhante foi realizado em fêmeas bubalinas submetidas a IATF (SOUZA, 2016). Entretanto, nesses animais, o tratamento com 300 mg de P4LA no dia 3 diminuiu a função luteínica e a taxa de concepção.

3. HIPÓTESES

O presente trabalho foi dividido em dois experimentos para verificar as seguintes hipóteses:

- As concentrações séricas de P4 serão mais elevadas nas receptoras de embrião que receberem 150mg de P4LA quatro ou sete dias após ovulação presumida, quando comparados aos animais não tratados;
- A administração de 150mg P4LA quatro ou sete dias após ovulação presumida de receptoras de embrião não comprometerá o desenvolvimento (diâmetro) e a funcionalidade (perfusão) do CL em relação às fêmeas do grupo controle não tratado;
- A administração de 150mg P4LA quatro ou sete dias após ovulação presumida resultará em aumento da taxa de prenhez de receptoras de embrião em relação às fêmeas do grupo controle não tratado;

3.1. Desenho hipotético Gráfico

O modelo hipotético gráfico do presente estudo está ilustrado na figura 1.

Figura 1. Desenho hipotético gráfico da resposta de receptoras de embriões ao tratamento com 150 mg de progesterona injetável de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida. A curva amarela representa o aumento da P4 circulante após a administração de P4LA).

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O presente estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos da administração de P4LA em diferentes momentos do início do ciclo estral (quatro ou sete dias após ovulação presumida) no perfil plasmático de P4, no desenvolvimento do CL e na taxa de prenhez de receptoras de embrião bovino.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração de 150 mg de P4LA quatro ou sete dias após ovulação presumida na concentração plasmática de P4 de receptoras de embrião;
- Avaliar o desenvolvimento (diâmetro) e funcionalidade (perfusão) do CL após administração de 150 mg de P4LA quatro ou sete dias após ovulação presumida de receptoras de embrião;
- Avaliar o efeito da administração de 150 mg de P4LA quatro dias ou sete dias após ovulação presumida na taxa de prenhez de receptoras de embrião aos 30 e 60 dias e na perda gestacional durante esse período.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Experimento 1

O Experimento 1 foi denominado “Efeito da administração de 150mg P4LA em diferentes momentos do ciclo estral no perfil plasmático de P4 e no desenvolvimento do CL”. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) o processo número 7547311016.

5.1.1. Animais e local do experimento

O experimento foi realizado no Polo Regional do Vale do Paraíba, em Pindamonhangaba, SP, Brasil, pertencente à Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Foram utilizadas 41 vacas multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*), paridas e com escore de condição corporal (ECC) de $2,75 \pm 3,01$. Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água e suplementação mineral *ad libitum*.

5.1.2. Protocolo de sincronização da ovulação e tratamento com P4LA

As vacas do presente estudo eram receptoras de embrião e foram tratadas com um protocolo de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação para TETF. As receptoras receberam um dispositivo intravaginal de P4 (DIB®, Syntex S.A.) novo e 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (BE; Gonadiol®, Syntex S.A.) em dia aleatório do ciclo estrado considerado como D-10. Oito dias após (D-2) o dispositivo foi retirado e foram administrados 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF; Ciclase DL®, Syntex S.A.) i.m. e 300 UI de eCG (Novormon®, Syntex, S.A.) i.m.. No D-1 foi administrado 1 mg de BE para indução da ovulação. O D0 foi considerado como o dia da ovulação presumida. (Figura 2).

Figura 2. Desenho esquemático do delineamento do Experimento 1: estudo da concentração plasmática de progesterona (P4) em vacas dos grupos Controle (sem tratamento adicional), P4D4 (administração de 150 mg de P4 de longa ação - P4LA - i.m quatro dias após a ovulação presumida) e P4D7 (administração de 150 mg de P4LA i.m sete dias após a ovulação presumida). As vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4 e 2mg de benzoato de estradiol (BE) - 8 dias - 300 UI de gonadotrofina crônica quina (eCG) e 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF) – 1 dia - 1 mg de BE - 1 dia – ovulação presumida (D0).

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

5.1.3. Tratamento com P4LA

Todas as vacas ($n = 41$) foram avaliadas quatro dias após ovulação presumida (D4) e aquelas que ovularam ($n = 36$) foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais: Grupo Controle ($n = 13$), as vacas não receberam suplementação com P4LA; Grupo P4D4 ($n = 11$), as vacas receberam 150 mg P4LA i.m. (Sincrogest[®] Injetável, Ourofino Saúde Animal) no D4 e Grupo P4D7 ($n = 12$), as vacas receberam 150 mg P4LA i.m. no D7 (Figura 2).

5.1.4. Coleta de sangue para dosagem de P4

Realizou-se coleta de sangue da veia caudal em todas as vacas para mensuração da concentração plasmática de P4, a cada 24 horas, do D4 até o D10, e a cada 48 horas, do D11 ao D25 (Figura 2). Para tal, foi utilizado um tubo

de 4 mL com EDTA (Laborvacum®, Labor Import) para cada receptora. As amostras de sangue foram colocadas em centrífuga KC4 (Kindly®) a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 20 minutos, para obtenção do plasma sanguíneo. Após a centrifugação as amostras foram pipetadas e o plasma foi colocado em microtubos de 2,0 mL de tampa plana (Ficherbrand® USA) e armazenado a -20° C para posterior dosagem de P4.

As dosagens de P4 foram realizadas por radioimunoensaio (RIA) no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária na UNESP, Campus Araçatuba. Para a dosagem das amostras foi utilizado o *Kit ImmuChem™ Coated Tube Progesterone* (MP Biomedicals^{MT}). O limite de detecção do ensaio foi de 0,534 e o limite de quantificação foi 0,351. O valor do coeficiente de variação para controle alto foi de 0,64% e para o controle baixo de 5,68%.

5.1.5. Avaliação por ultrassonografia Color Doppler

A avaliação do desenvolvimento, funcionalidade e diâmetro do CL foi realizada por ultrassonografia (Mindray® M5Vet, China) com sonda linear transretal a cada 24 horas, do D4 até o D10, e a cada 48 horas, do D11 ao D25 (Figura 2). A funcionalidade do CL foi determinada com base na avaliação do fluxo sanguíneo central (FSC) e periférico (FSP) do CL utilizando o modo Color Doppler do ultrassom. A escala de classificação utilizada, foi baseada no trabalho de Pugliesi et al. (2017), no qual foi utilizada a variação de escore de vascularização de 0 a 4 pontos, sendo 0 definido como ausência de fluxo e 4 como fluxo máximo.

Na tabela 1 está ilustrada a escala utilizada no presente estudo, que teve como base o trabalho supracitado (PUGLIESI et al., 2017). O diâmetro do CL foi definido como a média do maior diâmetro do CL e do diâmetro perpendicular.

Tabela 1. Classificação da funcionalidade do corpo lúteo (CL) de acordo com o fluxo sanguíneo central (FSC) e periférico (FSP) obtidos por imagens ultrassonográficas em modo Color Doppler.

Escore	Fluxo Sanguíneo Central	Fluxo Sanguíneo Periférica
0 (0%)
1 (1 a 25%)
2 (26 a 50%)
3 (51 a 75%)
4 (76 a 100%)

Fonte: LUGO L.C. (2018); com critérios de avaliação de Pugliesi et al. (2017)

5.2. Experimento 2

O Experimento 2 foi denominado “Efeito da administração de P4LA em diferentes momentos do ciclo estral na taxa de prenhez de receptoras de embrião”. O estudo foi aprovado pelo Departamento de Saúde animal da República Dominicana (Ganaderia, Ministério de Agricultura de lá República Dominicana) por ter sido desenvolvido nesse país.

5.2.1. Animais e local

Foram utilizadas 787 receptoras de três fazendas comerciais (Fazenda Los Angeles, Fazenda Rancho Doña Maria e Fazenda Batero). Todas as fazendas possuíam rebanho mestiço de cruzamento entre Brahman e Romana Rojo (*Bos indicus*) com gado *Bos taurus*. Todas as vacas do estudo tiveram acesso a pasto de *Brachiaria decumbens*, sal mineral e água *ad libitum*.

5.2.2. Protocolo de sincronização da ovulação para TETF e tratamento com P4LA

No D0, todas as receptoras foram avaliadas por ultrassonografia para verificar a ocorrência de eventuais problemas reprodutivos, os quais foram critério de exclusão desses animais do estudo. Foram selecionadas para iniciar o protocolo de sincronização de emergência folicular e ovulação 790 fêmeas (vacas e novilhas). As fêmeas foram tratadas com o mesmo protocolo de sincronização descrito no experimento 1. Brevemente, um dispositivo intravaginal de P4 (DIB[®], Syntex S. A.) foi inserido conjuntamente à administração de 2 mg de BE (Gonadiol[®], Syntex S.A.) em dia aleatório do ciclo estral considerado como D-10. Após oito dias (D-2), o dispositivo foi retirado e foram administrados 0,530 mg de cloprostenol sódico (PGF; Ciclase[®] DL, Syntex S.A.) i.m. e 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, S. A.) i.m. No D-1 foi administrado 1mg de BE para indução da ovulação. O D0 foi considerado como o dia da ovulação presumida. No D4, os animais foram homogeneamente divididos em 3 grupos experimentais, de acordo com o ECC e a categoria (vaca ou novilha). As

receptoras do grupo controle (n = 168) não receberam tratamento adicional com P4LA. As receptoras do grupo P4D4 (n = 201) receberam tratamento com 150 mg de P4LA i.m. (Sincrogest® Injetável, Ourofino Saúde Animal) no D4. As receptoras do grupo P4D7 (n = 181) receberam tratamento com 150 mg de P4LA i.m. no D7 (Figura 3).

Figura 3. Desenho esquemático do delineamento do Experimento 2: avaliação do efeito do tratamento com progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de prenhez de receptoras de embriões.

- 1- Grupo Controle: (n=168)
- 2-Grupo P4 Dia4: (n=201)
- 3-Grupo P4 Dia7: (n=181)

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

5.2.3 Avaliações ultrassonográficas

Foram realizadas avaliações ultrassonográficas (DG60; Mindray® DP 2200 Vet, China;) no D7, imediatamente antes da TE, para identificar a presença e mensurar o diâmetro do CL e nos D30 e D60 para avaliar a taxa de prenhez e a perda gestacional durante este período.

5.2.4. Produção *in vitro* de embriões

Os embriões foram produzidos pelo laboratório Embriodom Biotecnologia

Animal, localizado em Santo Domingo, República Dominicana. Para tal, as fêmeas doadoras de oócitos foram submetidas à OPU no mesmo dia em que as receptoras estavam no D0 de seu protocolo (dia da ovulação presumida das receptoras), para assegurar a sincronia entre o estágio de desenvolvimento embrionário e o dia do ciclo estral das receptoras desses embriões.

Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados utilizando o método de OPU descrito por Bayeux (2017). Após a seleção, os CCos foram colocados em microtubos e levados ao laboratório de PIVE em uma transportadora de oócitos (Labmix®, WTA) com temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa controlada (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂). Na chegada ao laboratório os microtubos com os CCOs foram transferidos para uma incubadora de bancada (EVE®, WTA) para continuarem com o processo de maturação por 24 horas em temperatura de 38,5°C e ambiente com baixa tensão de oxigênio (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂).

Para a realização da FIV foram utilizadas palhetas de sêmen congelado de touros da raça Brahman. As palhetas de sêmen de 0,25 mL foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e centrifugadas a 1.200 rpm por 30 minutos em gradiente de Percoll, para obtenção dos espermatozoides (sptz) móveis e para a remoção do diluidor e do plasma seminal. O *pellet* formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll. A concentração dos sptz foi ajustada para 1x10⁶ sptz/mL (BAYEUX, 2017). O meio utilizado na FIV foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10µg/mL de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com microgotas de 70µl cobertas com óleo mineral por 18-20 horas a 38,5°C (começando 24h após o procedimento de OPU), com baixa tensão de oxigênio. Após 18h da FIV, os prováveis zigotos passaram por remoção do excesso das células do *cumulus* e foram transferidos para uma placa contendo microgotas cobertas com óleo mineral. Estes permaneceram na incubadora de bancada (EVE® - WTA) em placa contendo microgotas de 70µL de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), cobertos por óleo mineral, de acordo com os protocolos de Watanabe (1999), por um período de 7 dias em temperatura de 38,5°C, com baixa tensão de oxigênio (6:5:89) e pressão hidrostática de 5 mmHg. Após 72 horas da inseminação (hpi) foi realizado o primeiro *feeding*

(troca de 50% do meio) e a contagem dos zigotos clivados para o cálculo da taxa de clivagem (número de estruturas clivadas/número de oócitos viáveis). Após 120 hpi (D5 do cultivo) realizou-se o segundo *feeding*. A taxa de produção de embriões foi calculada no D7 (número de embriões produzidos/número de oócitos viáveis). Os blastocistos em D7 classificados como blastocistos expandidos (BX) grau I, ou seja, embriões de ótima qualidade, foram separados dos demais para envase em palhetas 0,25 mL.

5.2.5. Transferência dos embriões

A TE foi realizada a fresco (sem criopreservação) e apenas com embriões classificados como BX grau I. Durante o transporte (2-3 h) do laboratório até o momento da TE nas fazendas, todas as palhetas com os embriões foram mantidas em uma transportadora de embriões (TE-100 COMPACT®, WTA). Já nas fazendas, o veterinário responsável pela TE realizou palpação retal, seguida por avaliação ultrassonográfica (Mindray® DP 2200 Vet, China) de todas as receptoras previamente sincronizadas para avaliar o CL (localização e diâmetro) e, assim, transferir o embrião no corno ipsilateral ao CL. Apenas receptoras com CL entre 14 a 22 mm de diâmetro foram utilizadas na TE. As receptoras que compuseram o grupo P4D7 receberam a dose de P4LA imediatamente após da TE.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.1. Experimento 1

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, com três grupos experimentais (Controle, P4D4 e P4D7) e 14 dias de avaliação (4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23 e 25). As variáveis avaliadas foram concentração de P4 plasmática, diâmetro do CL (mm) FSC (0 a 4) e FSP (0 a 4) do CL. A análise estatística foi realizada utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.4 para Windows; SAS Inst., Cary, NC).

Todos os dados foram testados para a normalidade dos resíduos usando o procedimento *UNIVARIATE*, de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados não distribuídos normalmente foram transformados antes da análise se houvesse melhoria na distribuição residual e os *outliers* foram removidos quando necessário. Os efeitos foram determinados por ANOVA unidirecional, utilizando somas de quadrados do Tipo III.

O procedimento *GLIMMIX* ajustado a distribuição *Gaussiana* foi utilizado para analisar os dados. O modelo incluiu grupo, tempo e interações bidirecionais significativas como efeitos fixos. A opção de tempo residual foi inserida como efeito aleatório. Grupo (animal) foi incluído como sujeito. Além disso, a opção *ddfm = kenwardroger* foi incluída no modelo, ajustando os graus de liberdade para as variâncias. A estrutura de covariância utilizada para todas as afirmações repetidas foi não estruturada, o que forneceu o melhor ajuste para essas análises, de acordo com o critério de informação de Akaike. O teste *post hoc* de diferença significativa honesta de Tukey foi realizado para determinar as diferenças. Os valores estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

6.2. Experimento 2

O desenho experimental aplicado foi um delineamento inteiramente casualizado. As variáveis avaliadas foram taxa de concepção no D30 (%), taxa de concepção no D60 (%) e perda gestacional entre D30 e D60 (%). A análise estatística foi realizada utilizando o *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.4 para Windows; SAS Inst., Cary, NC).

Os dados categóricos foram analisados pelo procedimento *GLIMMIX* ajustando uma distribuição Binomial com a função *Logit Link*. Além disso, a opção *ddfm = kenwardroger* foi incluída no modelo, ajustando os graus de liberdade para as variações. O tratamento foi mantido nos modelos finais, mas a interação entre tratamento e co-variáveis foi eliminada por *Backward*, com base nos critérios estatísticos de *Wald*, quando $P > 0,20$. Os modelos incluíram grupo, classe de diâmetro do CL, paridade (nulíparas, primíparas e pluríparas), fazendas, qualidade embrionária e interações bidirecionais significativas como efeitos fixos. Para a classificações do CL foram utilizadas as classes $CL \leq 18$ mm e $CL > 18$ mm). O resíduo foi inserido como efeito aleatório. Grupo (animal) foi incluído como sujeito. O teste post hoc de diferença significativa honesta de Tukey foi realizado para determinar as diferenças. Os valores são apresentados em porcentagem (%). Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

7. RESULTADOS

7.1. Experimento 1

A taxa de aproveitamento (vacas com CL/ total de vacas) das receptoras após o tratamento de sincronização foi de 87.8% (n= 36/41). Efeito de tempo foi detectado para a concentração plasmática de P4, com aumento gradual do D4 ao D10-14 e queda subsequente. Não foi observado efeito de tratamento com P4LA ($P = 0,92$) tanto no D4 quanto no D7 sobre a concentração plasmática geral de P4. No entanto, verificou-se interação tratamento*tempo para essa variável ($P = 0,004$), sendo que as receptoras tratadas com P4D4 e P4D7 apresentaram concentrações plasmáticas de P4 superiores ao grupo Controle (sem P4LA) na coleta seguinte (24h) à administração de P4LA (Figura 4).

Também não houve efeito do tratamento com P4LA no diâmetro do CL ($P = 0,70$) e tampouco interação tratamento*tempo para essa variável ($P = 0,59$). Entretanto, houve efeito de tempo ($P = 0,001$) para o diâmetro do CL durante o ciclo estral, com aumento gradual após a ovulação, seguido de platô e queda (Figura 5).

Com relação ao FSC e FSP, também não foi verificado efeito dos tratamentos com P4LA no D4 e D7 ($P = 0,16$ e $0,92$, respectivamente) para essas variáveis ou interação tratamento*tempo ($P = 0,97$ para ambas). Entretanto, observou-se efeito de tempo ($P = 0,001$ para ambas), com queda abrupta tanto do FSC quanto FSP a partir do D14 do ciclo estral, conforme ilustrado nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 4. Concentração plasmática de progesterona (P4) durante o ciclo estral de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) após o tratamento com 150 mg de P4 de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 5. Diâmetro do corpo lúteo durante o ciclo estral de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) após o tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 6. Fluxo sanguíneo central (FSC) do corpo lúteo (CL) de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.

4

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 7. Fluxo sanguíneo periférico (FSP) do corpo lúteo (CL) de receptoras de embrião (*Bos indicus*, Nelore) tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.

4

Efeito de tempo, $P=0,001$
Efeito de tratamento, $P=0,92$
*Interação tempo*tratamento, $P=0,97$*

3

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

7.2. Experimento 2:

A taxa de aproveitamento ao protocolo de TE foi de 69.9% ($n = 550/787$). A taxa de concepção das receptoras de embrião dos grupos Controle (41.4%; $n = 70/168$), P4D4 (42.3%; $n = 89/201$) e P4D7 (41.2%; $n = 80/181$) foi semelhante ($P = 0,41$) aos 30 dias de gestação (Figura 8). Da mesma forma, não houve diferença na taxa de concepção aos 60 dias de gestação e na perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação nas receptoras de embrião dos três grupos estudados ($P = 0,49$ e $0,73$, respectivamente; Figuras 9 e 10).

Figura 8. Efeito do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 30 dias de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 9. Efeito do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 60 dias de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 10. Perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras tratadas com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Como análise complementar, foi estudado o efeito do diâmetro do CL no momento da TE sobre a taxa de prenhez aos 30 e 60 dias e sobre a perda gestacional durante esse período das receptoras de embrião. Para tal, as receptoras foram agrupadas em classes de acordo com o diâmetro do CL no dia da TE: receptoras com $CL \leq 18$ mm (entre 14 e 18 mm) vs receptoras com $CL >$

18 mm (entre 18,1 e 22 mm). Não foi observado efeito do diâmetro do CL sobre a taxa de concepção aos 30 e aos 60 dias de gestação e tampouco sobre a perda gestacional das de receptoras de embriões ($P = 0,87$, $0,52$ e $0,09$, respectivamente; Figuras 11, 12 e 13). No entanto, houve tendência ($P = 0,09$) de ocorrer maior perda gestacional em receptoras que possuíam CLs ≤ 18 mm (7,9%) em comparação às que possuíam CL > 18 mm (4,1%; Figura 13).

Figura 11. Efeito do diâmetro do corpo lúteo (CL ≤ 18 mm vs > 18 mm) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a taxa de concepção aos 30 dias de gestação de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 12. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs > 18 mm) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a taxa de concepção aos 60 dias de gestação de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 13. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs > 18 mm) no momento da transferência de embrião (TE) sobre a perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Quando se analisou o efeito dos tratamentos conforme o diâmetro do CL, também se observou que não houve efeito entre os tratamentos na taxa de concepção aos 30 e 60 dias ($P = 0,41$ e $0,52$, respectivamente), bem como na perda gestacional entre 30 e 60 dias ($P = 0,73$) nas receptoras com $CL \leq 18$ mm e $CL > 18$ mm (Figuras 14, 15 e 16). Também não houve interação tratamento*diâmetro do CL ($P = 0,17$, $0,36$ e $0,61$, respectivamente). No entanto, numericamente as vacas com CLs menores se beneficiaram do uso da P4LA no D4 e D7 (grupos P4D4 e P4D7 comparativamente ao grupo controle) em termos de taxa de concepção aos 30 e 60 dias (Figuras 14 e 15). Finalmente, tendência ($P = 0,089$) de maior perda gestacional foi observada em receptoras com CLs de menor diâmetro em comparação às que possuíam CLs maiores, independentemente do tratamento (Figura 16).

Figura 14. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs ≥ 18 mm) e do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 30 dias de gestação em receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 15. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs > 18 mm) e do tratamento com 150mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a taxa de concepção aos 60 dias de gestação em receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

Figura 16. Efeito do diâmetro do corpo lúteo ($CL \leq 18$ mm vs ≥ 18 mm) e do tratamento com 150 mg de progesterona de longa ação (P4LA) i.m. quatro (D4) e sete (D7) dias após o dia da ovulação presumida sobre a perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de receptoras de embrião.

Fonte: LUGO, L.C. (2018)

8. DISCUSSÃO

As hipóteses do Experimento 1 foram parcialmente confirmadas. O tratamento com P4LA durante o diestro inicial (D4 e D7 pós ovulação presumida) de receptoras de embrião Nelore (*Bos indicus*) promoveu aumento das concentrações plasmáticas de P4 conforme esperado, porém esse aumento foi transitório, ocorrendo apenas nas primeiras 24 horas após a administração da P4LA. Esses resultados estão de acordo com os obtidos previamente em estudos com vacas de corte (PUGLIESI et al., 2014), vacas de leite (SOUZA, 2015) e bubalinos (SOUZA, 2016), nos quais foi verificado que quanto maior a dose de P4LA administrada maior a concentração plasmáticas de P4 observada, bem como maior a meia vida do tratamento.

Além disso, o desenvolvimento do CL (diâmetro, FSC e FSP) não foi prejudicado pelos tratamentos com P4LA em nenhum dos dias testados (D4 e D7), confirmando a hipótese do presente estudo e embasando a segurança de seu uso neste período do ciclo estral das receptoras de embrião. De forma contrária, em um trabalho prévio, a administração de P4 no início do ciclo estral, durante a formação do CL, alterou a funcionalidade do CL e a produção de P4, antecipando a luteólise e reduzindo a duração do ciclo estral (PUGLIESI et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado por (GARRETT et al., 1988a), no qual foi reportado luteólise precoce (antecipação do estro subsequente em 5 dias) em vacas de corte (*Bos taurus*) tratadas com 100 mg de P4 nos quatro primeiros dias após detecção de estro. Diferentemente, no presente trabalho, no qual a P4LA foi administrada quatro e sete dias após ovulação, não foram observadas diferenças entre o momento da ovulação sincronizada e o retorno ao estro para os diferentes tratamentos. Efeitos semelhantes foram reportados em estudos com novilhas taurinas de corte (O'HARA et al., 2014), novilhas da raça Holandesa (CARTER et al., 2008) e vacas da raça Holandesa (MONTEIRO et al., 2014), nos quais não foi relatado efeito do tratamento com P4 na duração do ciclo estral.

Ainda com relação à funcionalidade do CL, observou-se no presente estudo que houve aumento da concentração plasmática de P4 do D4 ao D10,

seguido de platô do D10 ao D14 e queda abrupta a partir do D16, independentemente do tratamento. Da mesma maneira, tanto o diâmetro quanto o FSC e o FSP do CL apresentaram grande redução a partir do D16 do ciclo estral, com padrão semelhante entre os grupos experimentais. Esses achados demonstraram que o CL permaneceu ativo, mesmo após a administração de P4LA no início do ciclo estral e sua luteólise não foi antecipada em relação às vacas não tratadas com P4LA. Sendo assim, foi confirmada a hipótese de que o tratamento com P4LA quatro ou sete dias após a ovulação sincronizada aumenta a concentração de P4 durante o ciclo estral sem interferir no desenvolvimento e na funcionalidade do CL.

Já a hipótese do Experimento 2 foi negada, uma vez que as taxas de concepção e a perda gestacional das receptoras de embrião bovino tratadas com P4LA foram semelhantes às das não tratadas. Sabe-se que durante o período de reconhecimento materno-fetal, para que gestação seja bem-sucedida, é necessário que embrião se desenvolva (aumente de tamanho) o suficiente para produzir quantidades altas de proteína antiluteolítica (IFN- τ) para prevenir a secreção luteolítica de PGF2a pelo endométrio (BETTERIDGE et al., 1980; GREALLY; DISKIN; SREENAN, 1996; MANN et al., 1999). Nesse contexto, um dos principais hormônios responsáveis pelo controle do estabelecimento da gestação é a P4, que estimula a produção de secreções endometriais (histotrofo) que são benéficas para o desenvolvimento bem-sucedido do embrião e, conseqüentemente, a sobrevivência do concepto (GEISERT et al., 1992; GRAHAM; CLARKE, 1997). De fato, diversos estudos evidenciam uma associação positiva entre as concentrações séricas de P4, o desenvolvimento embrionário e as taxas de prenhez em bovinos (FUENTES; DE LA FUENTE, 1997; MANN et al., 1999; SANTOS et al., 2000; BARUSELLI et al., 2001; BINELLI et al., 2001; THATCHER et al., 2001; NASSER et al., 2004; MARQUES et al., 2005). No entanto, essa melhora não foi observada no presente estudo.

De forma semelhante ao presente estudo, Monteiro et al. (2015) não observaram efeito da suplementação com dispositivo de 1,9 g de P4 do D3 ao D17 após a IATF em vacas leiteiras na taxa de prenhez 32 dias após a IA (Controle = 32,0% vs. Suplementada = 31,8%) e na perda gestacional (15,6% vs. 17,6%, respectivamente). Ainda, os autores reportaram comprometimento da gestação após TE em ambos os grupos suplementados com dispositivo com 1,9

g de P4 inserido no D4 (21,3%) e no D14 (15,2%) em comparação às receptoras não suplementadas (39,7%), sem, no entanto, haver efeito sobre a perda de gestação. De maneira similar, no presente trabalho não foi observada diferença na sobrevivência embrionária entre 30 e 60 dias entre os grupos tratados ou não com P4LA. A ausência de efeito positivo da suplementação com P4LA no presente estudo pode ser devido à dose de P4LA utilizada. Na tentativa de não prejudicar a funcionalidade do CL, principalmente em zebuínos, que apresentam redução na metabolização hepática de P4 (BATISTA, 2015), foi utilizada a dose de 150 mg, que pode não ter sido suficiente para causar as alterações necessárias no ambiente uterino para aumentar a taxa de gestação.

Porém, verificou-se que nas receptoras com a presença de um CL de menor diâmetro no momento da TE (< 18 mm) a taxa de concepção foi numericamente aumentada em relação ao controle quanto estas receberam tratamento com P4LA. Verificou-se aumento de 44,2% (de 27,1 para 39,1%) na taxa de gestação do grupo controle para o grupo P4D4 e de 49,1% (de 27,1 para 40,4%) na taxa de gestação do grupo controle para o grupo P4D7. Esses dados, apesar de não apresentarem diferença estatística, corroboram os resultados de Souza et al. (2015), que demonstraram efeito positivo da administração de 900 mg de P4LA durante a época quente do ano para incrementar a fertilidade de vacas Holandesas de alta produção. Pugliesi et al., (2014), também verificaram diferenças na taxa de prenhez à IATF de vacas Nelore em anestro tratadas com 150 mg de P4LA 4 dias após a inseminação, com aumento significativo na taxa de prenhez em relação ao grupo não tratado (55,6% vs 46,0%; $P = 0,05$). No entanto, os mesmos autores não verificaram efeito do tratamento com P4LA quando as vacas estavam ciclando. De forma similar a este e ao presente estudo, outros estudos com o tratamento com P4 não demonstraram efeito no aumento das concentrações plasmáticas de P4 nas taxas de gestação (TRIBULO et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2002).

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos levaram a concluir que a administração de 150 mg de P4LA no dia quatro ou sete após a ovulação presumida aumentou transitoriamente as concentrações plasmáticas de P4 das receptoras de embrião tratadas (cerca de 24h após a administração), quando comparadas às do grupo controle não suplementado, sem causar comprometimento da funcionalidade e do desenvolvimento do CL (avaliados pelo seu diâmetro, FSC e FSP). No entanto, a suplementação com P4LA na dose de 150 mg não promoveu aumento da taxa de concepção, avaliada aos 30 e 60 dias, nem redução da perda gestacional durante esse período em receptoras de embrião tratadas quatro ou sete dias após a ovulação presumida. Novos estudos são necessários para elucidar o melhor momento e a dose de P4 a ser utilizada após a ovulação com a finalidade de melhorar a eficiência reprodutiva de receptoras de embriões bovinos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNWELL, C. V.; FARIN, P. W.; WHISNANT, C. S.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Maternal serum progesterone concentration and early conceptus development of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52, p. 75–81, 2015.
- BARROS, C. M.; DI STACI, L. C. **Farmacologia veterinária**. 1a. ed. [s.l.] Manole, 2012.
- BARUSELLI, P. S.; DE SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. a. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77–88, 7 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290257>>. Acesso em: 29 set. 2014.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SÁ FILHO, M. F.; NASSER, L. F. T.; RODRIGUES, C. a; BÓ, G. a. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 67–74, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003847>>.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, 2011.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. de O.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R.; BÓ, G. A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. **Theriogenology**, v. 55, p. 157 (abstract), 2001.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 479–86, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271474>>. Acesso em: 17 set. 2014.
- BATISTA, E. O. S. **Resposta ovariana, endócrina e molecular de novilhas**

taurinas e zebuínas submetidas a diferentes níveis nutricionais de ingestão de matéria seca [ovarian, endocrine and molecular responses in taurus and zebu heifers submitted to different levels of dry ma. 2015.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BATISTA, E. O. S.; DEL VALLE, T. A.; ORTOLAN, M. D. D. V.; RENNÓ, F. P.; NOGUEIRA, G. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. The effect of circulating progesterone on magnitude of the GnRH-induced LH surge: Are there any differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers? **Theriogenology**, v. 104, p. 43–48, 2017.

BAYARD, P.; GONÇALVES, D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C.; ANTONIAZZI, A. Q. Biotecnologias da reprodução animal. Produção in vitro de embriões bovinos. In: Ciência Veterinária nos Trópicos, S1, Recife-PE. **Anais...** Recife-PE: 2008.

BAYEUX, B. M. **Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção in vitro de embriões de novilhas da raça holandesa. [effect of category (prepubertal pubertal and pregnant) on in vitro embryo production in holstein heifers.]** 2017. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BAZER, F. W. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 199, n. 4, p. 373–84, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549616>>.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 745–67, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196409>>.

BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1173–1179, 2009.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; RANDALL, G. C.; MITCHELL, D.

Collection, description and transfer of embryos from cattle 10–16 days after oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 1, p. 205–216, 1980.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S.

Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451–1463, 2001.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 307–326, out. 2003. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003000976>>. Acesso em: 23 set. 2014.

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, n. 1, p. 53–72, 2002. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X01006574>>.

BÓ, G. A.; TRÍBULO, A.; MAPLETOFT, R. J. Actualización sobre la superovulación en bovinos. In: In: 5o Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, **Anais...**2012.

BURKE, C. R.; MIHM, M.; MACMILLAN, K. L.; ROCHE, J. F. Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrous cycle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 35, n. 1–2, p. 27–39, mar. 1994. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378432094900043>>.

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

CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507–517, 2009.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 123–147, 2010.

DEGRELLE, S. A.; CAMPION, E.; CABAU, C.; PIUMI, F.; REINAUD, P.; RICHARD, C.; RENARD, J. P.; HUE, I. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. **Developmental Biology**, v. 288, n. 2, p. 448–460, 2005.

DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Optimising reproductive performance of beef cows and replacement heifers. **animal**, v. 8, n. s1, p. 27–39, 7 maio 2014.

Disponível em:

<http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111400086X>.

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

DISKIN, M. G.; PARR, M. H.; MORRIS, D. G. Embryo death in cattle: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 244, 2012.

Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD11914>>.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/2013>.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/2014>.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/2015>.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 4, p. 784–794, 2009.

FORDE, N.; CARTER, F.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; SANDRA, O.; MANSOURI-ATTIA, N.; OKUMU, L. A.; MCGETTIGAN, P. A.; MEHTA, J. P.; MCBRIDE, R.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Conceptus-Induced Changes in the Endometrial Transcriptome: How Soon Does the Cow Know She Is Pregnant?1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 144–156, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.090019>>.

FUENTES, S.; DE LA FUENTE, J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipient heifers. In: Proceedings of the 13th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association: AETE, **Anais...**1997.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Progesterone supplementation in the early luteal phase after artificial insemination improves conception rates in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 90, p. 20–24, mar. 2017.

Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16305465>>.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; GRIES, L. K.; WETTEMANN, R. P.; BUCHANAN, D. S. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2 alpha release and the interestrus interval in the bovine. **Prostaglandins**, v. 36, n. 1, p. 85–96, jul. 1988a. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3175025>>.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle.

Journal of reproduction and fertility, v. 84, n. 2, p. 437–46, nov. 1988b.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3199361>>.

GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 4, n. 3, p. 301–5, 1992.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438962>>.

GINTHER, O. J. Effect of progesterone on length of estrous cycle in cattle.

American journal of veterinary research, v. 31, n. 3, p. 493–6, mar. 1970.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5462750>>.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; SHAHIDUZZAMAN, A. K. M.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F2α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers.

Theriogenology, v. 74, n. 7, p. 1179–1186, out. 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X10002724>>.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues 1. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 4, p. 502–519, ago. 1997. Disponível

em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv.18.4.0308>>.

GREALLY, M.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16.

Journal of reproduction and fertility, v. 107, n. 2, p. 229–33, jul. 1996.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8882289>>.

HANNAN, M. A.; FUENZALIDA, M. J.; SIDDIQUI, M. A. R.; SHAMSUDDIN, M.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Diurnal variation in LH and temporal relationships between oscillations in LH and progesterone during the luteal phase in heifers.

Theriogenology, v. 74, n. 8, p. 1491–1498, nov. 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X10003390>>.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3–4, p. 245–264, dez. 2003.

Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003001672>>. Acesso em: 29 ago. 2014.

HUGENTOBLE, S. A.; SREENAN, J. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 4, p. 684–694, 2010.

IETS. **Statistics and data retrieval committee report. International Embryo Transfer Society - IETS - Newsletter**. [s.l: s.n.].

KENYON, A. G.; MENDONÇA, L. G. D.; LOPES, G.; LIMA, J. R.; SANTOS, J. E. P.; CHEBEL, R. C. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 223–230, jan. 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843201200317X>>.

LARSON, J. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 2, p. 311–318, 2011.

LARSON, S. F.; BUTLER, W. R.; CURRIE, W. B. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1–2, p. 172–179, nov. 2007. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432007000917>>.

LONERGAN, P. Embryonic loss in cattle: a cow or embryo-induced phenomenon? In: Proceeding of the 25th Annual Meeting A.E.T.E., Poznan, Poland. **Anais...** Poznan, Poland: 2009.

LONERGAN, P.; FORDE, N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. The Animal Consortium. **Animal**, v. 8, n. S1, p. 64–69, 2014.

LONERGAN, P.; WOODS, A.; FAIR, T.; CARTER, F.; RIZOS, D.; WARD, F.; QUINN, K.; EVANS, A. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 7, p. 861–868, 2007.

LOONEY, C. R.; BOUTLE, B. W.; ARCHIBALD, L. F.; GODKE, R. A. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 15, p. 13–22, 1981.

LOONEY, C. R.; NELSON, J. S.; SCHNEIDER, H. J.; FORREST, D. W. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 201–209, 2006.

LYNCH, P. R.; MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K. Treating cattle with progesterone as well as a GnRH analogue affects oestrous cycle length and fertility. **Animal reproduction science**, v. 56, n. 3–4, p. 189–200, 16 ago. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497915>>.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1–4, p. 1–25, out. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843209390104Y>>.

MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; HAYMAN, D. L. Pregnancy rates in lactating dairy cows used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving

supplemental progesterone. In: New Zealand Embryo Transfer Workshop, Hamilton, NZ, Hamilton: NZETW. **Anais...** Hamilton, NZ, Hamilton: NZETW: 1994.

MAILLO, V.; LOPERA-VASQUEZ, R.; HAMDI, M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 443–450, jul. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16300991>>.

MAMO, S.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Transcriptomic changes in the bovine conceptus between the blastocyst stage and initiation of implantation. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1–2, p. 56–63, set. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012002412>>.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 1–5, 1995.

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

MANN, G. E.; MERSON, P.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Conception Rate Following Progesterone Supplementation after Second Insemination in Dairy Cows. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 161–162, set. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023301905957>>.

MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; SILVA, R. C. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. Increased pregnancy rates in Bos taurus Bos indicus embryo recipients with treatments to increase plasma progesterone concentration. **Theriogenology**, v. 59, p. 369, 2005.

MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; SILVA, R. C. P.; BÓ, G. A.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; BINELLI, M.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics and pregnancy rates in Bos taurus x Bos indicus embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 2, p. 111–119, 2012.

MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; VIEIRA, L. M.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 974–980, 2012.

MONTEIRO, P. L. J.; NASCIMENTO, A. B.; PONTES, G. C. S.; FERNANDES, G. O.; MELO, L. F.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1215–1224, out. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15003428>>.

MONTEIRO, P. L. J.; RIBEIRO, E. S.; MACIEL, R. P.; DIAS, A. L. G.; SOLÉ, E.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; THATCHER, W. W.; SARTORI, R.; SANTOS, J. E. P. Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4907–4921, ago. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214003968>>.

MORRIS, D. G.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13–15-day-old cattle blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 1–2, p. 39–44, 2000.

NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, M. a; BÓ, G. a; BARUSELLI, P. S. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. **Theriogenology**, v. 62, n. 9, p. 1577–1584, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15511545>>. Acesso em: 17 set. 2014.

NIEMANN, H.; SACHER, B.; ELSAESSER, F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 23, n. 4, p. 631–639, 1985.

NISHIGAI, M.; KAMOMAE, H.; TANAKA, T.; KANEDA, Y. Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. **Journal of Reproduction and Development**, v. 44, p. 413–419, 1998.

NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M.; FUCK, E. J.; BARROS, C. M. High levels of progesterone, induced by eCG, decreased conception rates in heifers, after frozen embryo transfer. **Theriogenology**, v. 57, p. 556, 2002.

O'HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, A. D.; KELLY, A. K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 2, p. 328–336, 2014.

OKUMU, L. A.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; FITZPATRICK, E.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 143–153, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/REP-10-0113>>.

PARR, M. H.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; RIZOS, D.; DISKIN, M. G. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein–Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1–2, p. 7–14, nov. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432014002607>>.

PARR, M. H.; MULLEN, M. P.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; DISKIN, M. G. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2390–2396, maio 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212002068>>.

PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 687–697, 2003.

PUGLIESI, G.; OLIVERIA, M.; SCOLARI, S.; LOPES, E.; PINAFFI, F.; MIAGAWA, B.; PAIVA, Y.; MAIO, J.; NOGUEIRA, G.; BINELLI, M. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. **Reproduction in**

Domestic Animals, v. 49, n. 1, p. 85–91, fev. 2014. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12231>>.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. C. B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. In: Revista Brasileira de Reprodução Animal, 1, Santos - SP, Brazil. **Anais...** Santos - SP, Brazil: 2017.

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J. R. G.; BINELLI, M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239–1248, abr. 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15006792>>.

RIZOS, D.; CARTER, F.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; LONERGAN, P. Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1022–1029, mar. 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021000069X>>.

RIZOS, D.; MAILLO, V.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; LONERGAN, P. The Consequences of Maternal-Embryonic Cross Talk During the Periconception Period on Subsequent Embryonic Development. **Periconception in Physiology and Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1014, p. 69–86, 2017.

ROBERTS, R. M.; EALY, A. D.; ALEXENKO, A. P.; HAN, C.-S.; EZASHI, T. Trophoblast Interferons. **Placenta**, v. 20, n. 4, p. 259–264, maio 1999.

ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of Treatment with Progesterone on Pregnancy Rate and Plasma Concentrations of Progesterone in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 202–207, jan. 1989. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030289790986>>.

ROBINSON, R.; HAMMOND, A.; WATHES, D.; HUNTER, M.; MANN, G. Corpus LuteumEndometriumEmbryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance. **Reproduction in Domestic Animals**, v.

43, p. 104–112, jul. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2008.01149.x>>.

RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 2–4, p. 110–7, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640661>>. Acesso em: 17 set. 2014.

SALES, J. N. S.; DIAS, L. M. K.; VIVEIROS, A. T. M.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, J. C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1–2, p. 77–89, jun. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432007001364>>.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles influence the in vitro embryo production, but not the conception rate of fixed-time artificial insemination in Nelore cattle. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 27, n. 1, p. 206–206, 2014.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; POLL, L.; OVERTON, M. W.; REYNOLDS, J. P. Human chorionic gonadotropin influences numbers of corpora lutea, plasma progesterone and conception rates of dairy cows. In: Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, ICAR, Stockholm, Sweden. **Anais...** Stockholm, Sweden: 2000.

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

SCHMITT, E. J.; BARROS, C. M.; FIELDS, P. A.; FIELDS, M. J.; DIAZ, T.; KLUGE, J. M.; THATCHER, W. W. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. **Journal of animal science**, v. 74, n. 8, p. 1915–29, ago. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8856446>>.

SOUZA, D. C. de. **Efeito da administração de progesterona após a iatf no**

desenvolvimento do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes. [effect of progesterone administration after tai on the conceptus development and pregnancy rate in lactating buffaloes.]. 2016.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SOUZA, E. D. F. de. **Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas holandesas de alta produção submetidas à iatf. [effect of long-acting injectable progesterone in luteal function and conception rate of high producing holst.** 2015.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

SPENCER, T. E.; FORDE, N.; LONERGAN, P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5941–5950, 2016.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v. 27, p. 99–113, 1987.

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, n. 5, p. 1212–1224, set. 2005. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05000610>>.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S. M. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. v. 23, p. 243–254, 2002.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. P.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 75–89, jan. 2001. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X00004477>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal

reproduction: current methods and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 235–242, maio 2005. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:2005016>>.

TRIBULO, R.; NIGRO, M.; BURRY, E.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; BÓ, G. A. Pregnancy rates in recipients receiving CIDR- B devices immediately following embryo transfer. **Theriogenology**, v. 47, p. 37, 1997.

VAN CLEEFF, J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 795–807, nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727048>>.

VAN CLEEFF, J.; MACMILLAN, K. L.; DROST, M.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1117–1130, nov. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X96002841>>.

VIEIRA, L. M. **Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça holandesa em clima tropical. [factors associated to embryo production and survival in superovulation and embryo transfe.** 2013. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.