ALINE KEHRLE

**Reutilização de implantes de progesterona: do teste *in vitro* às
taxas de concepção na IATF**

**São Paulo
2011**

ALINE KEHRLE

**Reutilização de implantes de progesterona: do teste
in vitro às taxas de concepção na IATF**

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. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2457
FMVZ

Kehrle, Aline

Reutilização de implantes de progesterona: do teste *in vitro* às taxas de concepção na IATF / Aline Kehrle. -- 2011.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Reutilização de dispositivos. 2. Progesterona. 3. IATF. 4. Taxas de concepção. 5. Vacas ovariectomizadas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Reutilização de implantes de progesterona em inseminação artificial em tempo fixo", protocolado sob o nº 2186/2011, utilizando 8 (oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Reuse of progesterone intravaginal devices for fixed time artificial insemination", protocol number 2186/2011, utilizing 8 (eight) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

KEHRLE, Aline

Título: Reutilização de implantes de progesterona: do teste *in vitro* às taxas de concepção na IATF

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. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Aos meus pais, avós e irmãs,

Ao Hermano

DEDICO

AGRADEÇO

Ao meu pai, Udo Kehrle, bons conselhos, pela imensa bondade que tem dentro do coração, pelo bom humor. Um dos maiores responsáveis por tudo o que eu sou.

À minha mãe, Zuleika Provasi, que sempre apóia minhas decisões, mesmo quando estas envolvem quilômetros de distância. Ela me criou para o mundo, e incentiva minha coragem.

Às minhas irmãs, Karen (Oiii meu amooooor) e Ellen (levantando uma sobrancelha). Já estou rindo!!

Aos meus avós Erika e George, semeadores da minha profissão.

Ao Hermano. Como descrever o amor da sua vida? Um bretzel na neve é um bom começo... tão fácil gostar de você...

Ao Professor Ed Hoffmann Madureira, por sempre ter acreditado que eu poderia vencer os desafios quando eu mesma duvidava. Pela orientação, mas acima de tudo, pela amizade. Tenho você no coração.

Für Peter Karpf, mein deutscher Vater.

À minha tia Valquíria, minha avó Teresinha e prima Juliana.

À Renata Hurtado, minha irmã. Não tenho palavras...

Ao Médico Veterinário Manoel Pereira Neto, que não mediu esforços para me ajudar, mesmo para passar US em UMA vaca à uma da manhã. Obrigada, obrigada, obrigada!!

Ao Professor Rubens Paes de Arruda, pela sua seriedade, como pesquisador. Por lutar sempre por aquilo que acredita com afinco admirável e sempre estar interessado nos meus resultados.

Ao Professor Pietro Sampaio Baruselli, por sempre estar disposto a me ajudar, desde a minha monografia na graduação.

Ao Professor Mário Binelli, pelo incentivo com relação ao doutorado, pelo entusiasmo com que trata a ciência e as novas idéias.

Ao Professor Paulo Henrique Mazza, por mostrar que existe uma luz no fim do túnel da estatística. Muito obrigada pela ajuda.

Dem Tierarzt, Professor und Freund, Dr. Hans Peter Nohner, den ich seit meiner Kindheit bewundere.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, Prof. André Furrugen Cesar de Andrade, Profa. Anneliese de Souza Traldi, Profa. Camila Infantes Vannucchi, Prof. Cláudio Alvarenga, Profa. Eneiva Carla Celeghini, Prof. José Antônio Visintin, Prof. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Profa. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Prof. Renato Campanarut Barnabé e Profa. Valquíria Hyppolito Barnabé.

À Biogénesis-Bagó, em especial ao Reuel Luís Gonçalves, Thiago Silva Antônio e Orlando Valeriano de Oliveira Júnior, pelo material cedido e ajuda nos experimentos.

Às minhas companheiras de apê, Patrícia Helena Paiva Miguez (obrigada, sempre, por TUDO), Saara Scolari (hahahaha maluca), Lindsay Unno Gímenes (chica non hermosa, oráculo!!) e Carol Camargo Rocha (não me conformo até hoje que você está em Sampa!)

Ao Milton, pela amizade sincera, pelo bom humor e pela ajuda sempre. Tenho certeza que você tem clones para dar conta de tudo.

Ao Manoel Francisco de Sá Filho pela ajuda com a estatística.

Ao Zé, pela oportunidade em trabalhar com os clones, pela amizade e bom humor.

Aos amigos da pós e de Pira, Andres Mejía, Ju (em dose dupla), Dani, Fabiane, Paraguas, Moana, Kleber, Ana, Bixuca, Mayara, Esther, Gabriel, Guta, Lilian Kirsch, Julia Baldrighi, Julianne, Letícia, Milena, Melina, Paulinho, Tiago de Bem, Arroz, Juliano, Heidge, Simprão, Fernando Mesquita, Anelise...

À Ana Paula Mantovani e Alessandra Corallo Nicácio, minhas orientadoras na graduação.

Aos Kehrls de Brasília.

Aos IC Gabriel e César.

A todos os estagiários.

À Julia Torello e Joe, o casal que eu mais amo neste mundo.

À Renata Lopes Augusto (vamos comer um frozen??)

À Carolzinha e Alíne Reis (BM). Amo vocês!

Aos amigos Carol Nakata, Ana e Felipe, Olívia, Nina, Alíne Lenhare, Sophia, Verônica... sempre me apoiando nesta fase.

Aos funcionários do Campus de Pirassununga: Márcio, João, Zé Maria, Clayton, Ismael, Paulinho, Roberlei e Ricardo.

À Harumi Shiraishi pela competência, eficiência e paciência.

Às secretárias da Pós-graduação.

À bibliotecária Elza Faquim.

Aqueles que me ajudaram durante esse tempo, e que eu eventualmente tenha esquecido...

Obrigada

“Valorize seus limites e por certo não se livrará mais deles”

Richard Bach

RESUMO

KEHRLE, A. **Reutilização de implantes de progesterona:** do teste *in vitro* às taxas de concepção na IATF. [Reuse of progesterone intravaginal devices: from *in vitro* trial until FTAI conception rates]. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar implantes de Progesterona e suas reutilizações e avaliar sua eficiência. Três experimentos foram conduzidos: para avaliação das quantidades de P4 liberadas (Experimento *in vitro*), teores plasmáticos proporcionados (Experimento *in vivo* - vacas ovariectomizadas) e taxas de concepção na IATF (Experimento a campo – vacas paridas). No experimento *in vitro*, as três reutilizações do implante foram testadas em dissolutor de comprimidos com seis cubas, tendo uma solução álcool/água (60:40) como meio de difusão. Dois ensaios foram realizados, totalizando 12 implantes, sendo que no terceiro uso do dispositivo foi adicionado um anel de P4 (0,1g) e no quarto uso foram adicionados 2 anéis (0,1g cada). Os implantes novos foram testados em quadruplicata em um terceiro ensaio, com a mesma metodologia. Amostras foram coletadas nos tempos 2 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96h. As quantidades de P4 foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Para quantidade acumulada de P4, segundo dispositivo, em função do tempo, houve interação tempo*tratamento ($P=0,0002$). A quantidade de P4 diferiu ($P=0,0152$) conforme os subseqüentes usos dos implantes Cronipres® e também em relação ao tempo ($P<0.0001$). As equações que descrevem as quantidades liberadas são: dispositivos novos – $y = 240,69 + 84,127^A \times (R^2=0,9721)$; 2ºuso – $y = 75,918 + 42,595^B \times (R^2=0,8858)$; 3ºuso – $y=62,94 + 31,29^C \times (R^2=0,8629)$ e 4º uso – $y = 40,595 + 32,148^C \times (R^2=0,7205)$. No experimento *in vivo*, cada uso foi testado em triplicata, totalizando 12 animais. Os implantes foram inseridos e amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0 (momento da colocação do implante), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192h. As dosagens de P4 foram realizadas por Rádio-Imuno-Ensaio – RIE, com kit comercial da DPC (Diagnostics Products Corporation, EUA). A “AUC” diferiu entre o primeiro e segundo ($p<0,0001$), segundo e terceiro ($p=0,0010$), mas não entre o terceiro e o quarto usos ($p=0,8764$). Para análise estatística destes experimentos,

foram utilizados os PROC IML, GLM (comando REPEATED) e REG (teste *in vitro*, o qual gerou uma equação de regressão) ou avaliação da “area under the curve – AUC” no teste *in vivo*, pelo teste t. No teste a campo, quatro lotes de vacas de corte paridas (n=763) Nelore e Simental x Nelore, com idade variando entre 3 e 10 anos e condição corporal entre 4 e 7 (escala de 1-9) foram utilizados. No D0 do tratamento todos os animais receberam 2 mg i.m. de Benzoato de Estradiol (Cronibest® - Biogénesis-Bagó, Argentina) e um implante Cronipres® (implante novo, contendo 1 g de P4 n=194; implante de segundo uso, n=190; implante de terceiro uso acrescido de um anel complementar de P4 (0,1g de P4), n=191; implante de quarto uso com um anel de P4 usado e dois anéis de P4 novos, n=188). No D8 procedeu-se a retirada do implante e aplicação i.m. de 300 UI de eCG (Novormon®, Schering-Plough, EUA) e 150 µg i.m. de D-cloprostenol (Croniben®, Biogénesis-Bagó, Argentina). No D9, todos os animais receberam 1mg i.m. de Benzoato de estradiol (Cronibest®) e, após 30h, foi realizada a IATF. Em todos os lotes, os tratamentos foram igualmente distribuídos. Os dados foram submetidos à regressão com análise de variância (PROC GLIMMIX do SAS Statistical Analysis System®), separando-se como causas de variação: tratamento (implante novo, 2º uso, 3º uso e 4º uso), escore de condição corporal (ECC<5, ECC5 e ECC>5), ciclicidade (ciclando e não-ciclando), lote (1 a 4), período pós parto (<3 meses, 3 a 5 meses e >5meses) e grau de sangue (Nelore e Simental X Nelore) e suas interações, eliminando-se as variáveis do modelo quando estas apresentavam $p > 0.2$. No modelo final permaneceram as variáveis: tratamento ($p=0,18$), grau de sangue ($p=0,11$) e lote ($p=0,14$). Não houve diferença estatística nas TC segundo tratamento (implante novo – 55,1%, 2º uso – 47,9%, 3º uso – 48,7%, 4º uso – 44,15%) ($p=0.18$). A taxa de concepção geral foi de 49,1%.

Palavras-chave: Reutilização de dispositivos. Progesterona. IATF. Taxas de concepção.

ABSTRACT

KEHRLE, A. **Reuse of progesterone intravaginal devices:** from *in vitro* trial until FTAI conception rates [Reutilização de implantes de Progesterona: do teste *in vitro* às taxas de concepção na IATF]. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to characterize progesterone devices and their reuse and to evaluate its efficiency. Three experiments were conducted: to assess the quantities of released P4 (*in vitro* trial), plasma levels provided (*in vivo* trial - ovariectomized cows) and conception rates at FTAI (field trial – suckled beef cows). *In vitro* trial, the three reuses of devices were tested in a tablet dissolutor with six tanks, with a solution of alcohol / water (60:40) as way of dissemination. Two trials were conducted, totaling 12 implants. The third use of the device was added with a P4 ring (0.1 g) and in the fourth use two rings were added (0.1 g each). The new implants were tested in quadruplicate in a third trial, using the same methodology. Samples were collected at 2 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 96h. The amounts of P4 were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For the cumulative amount of P4, there was a time * treatment interaction ($P = 0.0002$). The amount of P4 differed ($P = 0.0152$) as the subsequent use of implants Cronipres® and also over time ($P < 0.0001$). The equations that describe the amounts released are: new devices - $y = 240.69 + 84.127^A x$ ($R^2 = 0.9721$), second use - $y = 75.918 + 42.595^B x$ ($R^2 = 0.8858$), third use - $y = 62.94 + 31.29^C x$ ($R^2 = 0.8629$) and fourth use - $y = 40.595 + 32.148^C x$ ($R^2 = 0.7205$). In the *in vivo* trial, each use was tested in triplicate, totaling 12 animals. The implants were inserted and blood samples were collected at time 0 (time of implant insertion), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 192h. The dosages of P4 were performed by Radio-Immuno-Assay – RIA, using a commercial kit from DPC (Diagnostics Products Corporation, USA). The area under the curve differed between the first and second ($p < 0.0001$), second and third ($p = 0.0010$) but not between the third and fourth use ($p = 0.8764$). For the statistical analysis of these experiments, the PROC IML, GLM (command REPEATED) and REG (for *in vitro* test, which generated a regression equation) or the t test (for the area under the curve assessment – *in vivo* test), were used

(Statistical Analysis System - SAS). In the field test, four groups of suckled Nellore and Simmental x Nellore beef cows ($n = 763$), aged between 3 and 10 years and body condition score between 4 and 7 (range 1-9) were used. On D0 of treatment all animals received 2 mg im of estradiol benzoate (Cronibest ® - Biogénesis-Bagó, Argentina) and an implant Cronipres ® (new implant containing 1 g of P4, $n = 194$; second use implant, $n = 190$; third use implant added with of an additional ring of P4 (0.1 g of P4), $n = 191$; fourth use implant added with a used ring of P4 and two new rings of P4, $n = 188$). On D8 the implant was removed and an i.m. application of 300 IU of eCG (Novormon ®, Schering-Plough, USA) and 150 mg i.m D-cloprostenol (Croniben ®, Biogénesis-Bagó, Argentina) was performed. On D9, all animals received 1 mg i.m. of estradiol benzoate (Cronibest ®) and after 30h, FTAI was performed. In all groups, the treatments were equally distributed. Data were subjected to regression with analysis of variance (PROC GLIMMIX in SAS ® Statistical Analysis System), separating as causes of variation: treatment (new use, second, third and fourth use), body condition score (BCS <5, ECC5 and BCS > 5), cyclicity (non-cycling and cycling), groups (1-4), postpartum period (<3 months, 3-5 months and > 5mounths) and breed (Nellore and Simmental x Nellore) and their interactions, eliminating the variables of the model when they showed $p > 0.2$. In the final model was consisted of treatment ($p = 0.18$), breed ($p = 0.11$) and group ($p = 0.14$). There was no statistical difference in conception rates between treatments (new device - 55.1%, second use - 47.9%, third use - 48.7% and fourth use - 44.15%) ($p = 0.18$). The overall conception rate was 49.1%.

Keywords: Reuse of devices. Progesterone. FTAI. Conception rates.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade acumulada de P4 conforme os usos subseqüentes do implante Cronipres® em função da raiz quadrada do tempo, e valores de P para os modelos testados. Pirassununga, 2011.....	50
Tabela 2 – Teores plasmáticos de P4 conforme os usos subseqüentes do implante Cronipres® ao longo do tempo. Pirassununga, 2011.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Protocolo de IATF utilizado.....	46
Gráfico 1 – Liberação de P4 ao longo do tempo conforme as reutilizações dos implantes.....	49
Gráfico 2 – Liberação acumulada de P4 ao longo do tempo.....	49
Gráfico 3 – Liberações parciais de P4 ao longo do tempo.....	53
Gráfico 4 – Teores plasmáticos de P4 em função do tempo.....	55
Gráfico 5 – Teores plasmáticos de P4 durante as primeiras 24h após inserção dos implantes novos e reutilizados.....	56
Gráfico 6 – Teores plasmáticos de P4 de 24-196h após a inserção dos implantes novos e reutilizados.....	58
Gráfico 7 – Taxas de concepção em função dos lotes.....	63
Gráfico 8 – Taxas de concepção em função dos usos subseqüentes do implante Cronipres®.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	DINÂMICA FOLICULAR NO CICLO ESTRAL.....	20
2.2	PROGESTERONA.....	21
2.2.1	Farmacocinética da P4.....	21
2.2.2	Teores plasmáticos de P4 durante o ciclo estral.....	23
2.2.3	Teores plasmáticos de P4 durante o tratamento com dispositivos intravaginais.....	24
2.2.4	Determinação in vitro da quantidade de P4 em matrizes poliméricas.....	25
2.3	SINCRONIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	27
2.3.1	P4 na sincronização do ciclo estral.....	27
2.3.2	Estradiol.....	28
2.3.3	eCG.....	28
2.3.4	Taxas de concepção com reutilização de implantes.....	29
2.4	PERÍODO PÓS-PARTO.....	30
2.4.1	Alterações hormonais no pós-parto.....	31
2.4.2	Ciclos curtos.....	31
2.4.3	Amamentação.....	33
2.4.4	Nutrição.....	33
2.4.5	Ações da P4 no pós-parto.....	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	EXPERIMENTO IN VITRO.....	40
3.1.1	Delineamento experimental.....	40
3.1.2	Local.....	40
3.1.3	Dispositivos.....	40

3.1.4	Metodologia.....	40
3.1.5	Análise estatística.....	41
3.2	EXPERIMENTO IN VIVO – VACAS OVARIECTOMIZADAS.....	42
3.2.1	Delineamento experimental.....	42
3.2.2	Local.....	42
3.2.3	Tratamentos, local e metodologia.....	43
3.2.4	Análise estatística.....	43
3.3	EXPERIMENTO À CAMPO – VACAS PARIDAS.....	44
3.3.1	Delineamento experimental.....	44
3.3.2	Local.....	44
3.3.3	Animais.....	45
3.3.4	Tratamentos.....	45
3.3.5	Lotes.....	45
3.3.6	Análise estatística.....	46
4	HIPÓTESES.....	47
4.1	EXPERIMENTO IN VITRO.....	48
4.2	EXPERIMENTO IN VIVO – VACAS CASTRADAS.....	48
4.3	EXPERIMENTO A CAMPO – VACAS PARIDAS.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	EXPERIMENTO IN VITRO.....	49
5.2	EXPERIMENTO IN VIVO – VACAS CASTRADAS.....	49
5.3	EXPERIMENTO A CAMPO – VACAS PARIDAS.....	54
6	CONCLUSÕES.....	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

As taxas de concepção, mais ainda o bezerro nascido, atestam ao produtor o quanto de sucesso o investimento na Inseminação Artificial em Tempo Fixo, IATF, obteve. É a primeira informação que torna palpável todo o procedimento.

Obviamente o cenário mais favorável é aquele em que taxas de concepção elevadas, ou pelo menos aceitáveis, estão associadas a um custo mais baixo. Sabe-se que os valores gastos com a IATF são menores atualmente, mas levando em conta a grande variação nos lucros do ramo pecuário, baixá-los ainda mais garante maior segurança.

A IATF surgiu para vencer o grande problema da Inseminação Artificial convencional, a falha na detecção do cio. Inicialmente, os implantes foram confeccionados com carga hormonal suficiente para períodos longos de tratamento, visando mimetizar a fase luteínica. Este tipo de tratamento conseguia sincronia, porém baixas taxas de concepção (TRIMBERGER; HANSEL, 1955).

A carga elevada de Progesterona (P4) permitia tratamentos tão longos quanto mais de duas semanas, período que foi gradualmente diminuído devido à descoberta de que as longas exposições prejudicavam a viabilidade do oócito. Em razão disso, a carga de P4 foi diminuída na manufatura de alguns implantes.

Mesmo com a menor quantidade inicial de P4, os implantes costumam ser reutilizados em larga escala no Brasil, com taxas de concepção variadas, porém aceitáveis. Esse procedimento vai ao encontro da vantagem em diminuir os custos da IATF. Deve-se, no entanto, levar em conta o risco que se corre em diminuir as taxas de concepção, ocorrendo prejuízo não apenas pelo fator financeiro, mas pela perda da tangibilidade do procedimento.

Apesar de muito utilizada, a reutilização dos implantes na IATF não proporciona repetibilidade nos resultados. Alguns trabalhos evidenciam tendência a haver menores taxas quando as inseminações ocorrem 54h após a retirada do implante (SÁ FILHO, 2009). Mesmo quando não existe a diferença estatística, as taxas de concepção são menores conforme as reutilizações, em se tratando de vacas

pluríparas (CREPALDI, 2010). Isso caracteriza o perigo de se rejeitar que a hipótese seja verdadeira.

O presente trabalho propõe testar as reutilizações do implante de P4 Cronipres® (Biogénesis-Bagó, Argentina) desde o implante novo até seu quarto uso, ou a terceira reutilização, caracterizando o implante não apenas quanto aos resultados obtidos à campo.

Passar-se-á primeiramente pelo teste *in vitro*, com o objetivo de conhecer as quantidades liberadas a cada uso e caracterizar a cinética de liberação de P4. Os teores plasmáticos atingidos também serão avaliados, utilizando-se para isso vacas castradas, implantadas com os diferentes usos do dispositivo.

Por fim, os usos subseqüentes serão testados a campo. Vacas paridas pluríparas serão avaliadas quanto à taxa de concepção após protocolo de IATF, realizado em uma propriedade com fins comerciais, portanto, dependente de bons resultados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão será abordada uma descrição de mecanismos de ação da P4 endógena e exógena, sua associação ao período pós-parto e à sincronização do ciclo estral e ovulação.

2.1 DINÂMICA FOLICULAR NO CICLO ESTRAL

Noventa e cinco por cento dos ciclos nas vacas possuem 2 ou 3 ondas foliculares, sendo o aumento das concentrações de FSH o responsável por suas emergências, fazendo com que os folículos antrais ingressem ao *pool* de folículos recrutados (GUINTER et al., 1996; BÓ, 2000).

A secreção de FSH estimula o crescimento daquele grupo de folículos primários que foram recrutados e estão em estágio antral (WALTERS; SCHALLENBERGER, 1984). Estes, em média, possuem aproximadamente 4 mm de diâmetro, e apresentam-se em número de sete a onze. Segue-se uma fase de evolução mútua de todos os aliciados, com duração em torno de três dias (GINTHER et al., 2003).

O aumento na pulsatilidade de FSH permite que alguns folículos cresçam por estímulo da mitose e formação do líquido folicular (HAFEZ, 2004) e adquiram receptores e responsividade ao LH. O folículo dominante aparenta ter maior capacidade de produção de estrógenos (BADINGA et al., 1991), emerge aproximadamente 6 horas antes na onda e apresenta um maior tamanho após os 3 dias de crescimento dos folículos selecionados (GINTHER et al., 2003).

Ao produzir estrógenos e inibina, o folículo dominante faz um *feedback* negativo à produção de FSH, retornando este a níveis basais (IRELAND; ROCHE, 1982; LUCY et al., 1992). Isso permite que aquele folículo responsivo ao LH entre em vantagem sobre os outros selecionados e continue seu crescimento (BALL; PETERS, 2006).

Tal processo caracteriza o final da fase de evolução comum dos folículos e inicia a seleção do folículo dominante, caracterizada pela diferença entre os padrões de desenvolvimento entre este e os restantes (KASTELIC, 2004).

O folículo dominante responde aos pulsos de LH e termina sua maturação, pelo incremento das ondas deste hormônio e estradiol, ovulando em caso de não haver um corpo lúteo responsivo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Na presença de um corpo lúteo responsivo – na fase do diestro – o folículo dominante permanece funcional por muitos dias e atinge seu tamanho máximo, contudo, entra em atresia, devido à baixa frequência pulsátil do LH causada progesterona (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). Com isso, há um aumento no FSH pela queda no estrógeno e inibina, e acréscimo, por *feedback*, estimulando nova onda até que haja luteólise, e a ovulação possa ocorrer. O número de ondas em cada ciclo depende da vida útil do corpo lúteo, e um folículo dominante permanece ativo por 5 a 7 dias em um ciclo de duas ondas (LUCY et al., 1992).

2.2 PROGESTERONA

Esta seção inclui uma revisão sobre a farmacocinética e teores plasmáticos da Progesterona.

2.2.1 Farmacocinética da Progesterona

A Progesterona (P4), produzida pelo Corpo Lúteo (ALLEN, 1935), é carregada pela transcortina após sua liberação na corrente sanguínea. O mecanismo de ação é mediado pelo seu receptor intracelular, que modula a responsividade da célula-alvo à P4. A expressão dos receptores, e conseqüentemente, a sensibilização do órgão-alvo, é controlada pelo estrógeno, que a aumenta, e pela P4, que a diminui, embora isso não ocorra em todos os tecidos-alvos. (GRAHAN; CLARKE, 1997).

No útero, por exemplo, a *down-regulation* pela P4 só é observada nas células epiteliais, mas não no miométrio e nas células do estroma. Substâncias, como o ácido retinóico, fatores de crescimento e outras já foram descritas por aumentar ou diminuir a expressão de receptores de P4 de maneira específica para determinadas células. O receptor da P4 pertence à superfamília dos fatores de transcrição, que tem como característica domínios funcionais específicos conservados entre espécies e famílias de indivíduos. O domínio central é a região mais conservada e o terminal carboxi, domínio da ligação com os ligantes, é menos conservada. Após a junção com o ligante, é mediada a dimerização e interação com coativadores, que permitem a modulação da transcrição. Na ausência do ligante o receptor de P4 permanece em conformação inativa, e a partir do momento que o ligante entra em contato, uma série de mudanças conformacionais ocorre. A partir daí a interação do receptor ativado com o DNA vai induzir a modulação da transcrição do gene e síntese protéica (GUIOCHON-MANTEL, 2000).

A meia vida plasmática da P4 é de 36,3 minutos, o que indica um alto “clearance” do sistema circulatório (MILLER et al., 1963). Williams (1962) reportou recuperações de 45% nas fezes de vaca leiteira prenha, e Miller et al. (1955) reportaram metabolização hepática e eliminação pelas fezes.

O fígado absorve a maior parte dos isótopos radioativos de P4 administrados em vacas, o que vai ao encontro da informação de que este órgão é responsável em maior parte pela retirada dos esteróides da circulação (ESTERGREEN et al., 1977). Ocorre também uma rápida absorção da P4 pelo tecido adiposo, e dietas contendo maiores concentrações de lipídeos reduzem o *clearance* deste hormônio, aumentando seus teores plasmáticos (HAWKINS et al., 1995).

A biotransformação dos hormônios esteróides ocorre por hidroxilação no citocromo P450, mais especificamente as subfamílias CYP3A e CYP2C (YOU, 2004), e o processo está correlacionado negativamente às concentrações plasmáticas ou teciduais de insulina (BARNETT et al., 1990; SHIMOJO et al., 1993). Lemley et al., demonstraram que um aumento na concentração de insulina nos hepatócitos diminuiu a atividade enzimática, e uma queda de 50% nesta atividade ocorreu em experimento com ovelhas ovariectomizadas (LEMLEY et al., 2008). Dietas

suplementadas com milho elevaram as concentrações de insulina em vacas leiteiras e a atividade da CYP3A e CYP2C foi diminuída pelo aumento da secreção de insulina (LEMLEY et al., 2010).

A progesterona administrada via vaginal possui um acesso direto ao útero, e causa efeitos comparáveis aos da fase luteínica. Em humanos, esse tipo de administração leva a menores concentrações plasmáticas do que a administração i.m., porém os efeitos no endométrio e estroma uterino foram os mesmos, hipotetizando este “sistema porta uterino” (MILES et al., 1994).

2.2.2 Teores plasmáticos de P4 durante o ciclo estral

Os teores plasmáticos de P4 variam não apenas ao longo do ciclo estral, como também quanto à raça. Animais Angus possuem em média teores de $5,3 \pm 0,3$ ng/mL, enquanto animais Brahman, $4,1 \pm 0,5$ ng/mL, entre os dias 7 e 17 do ciclo estral (dia zero = estro) (SEGERSON et al., 1984). No terceiro dia que precede o estro os valores encontrados foram de $3,21 \pm 0,89$ e no segundo dia $2,16 \pm 0,49$ ng/mL (WETTEMANN et al., 1972). Um dia antes do estro e nos dois dias após este, os teores foram menores que 1ng/mL, tanto para *Bos taurus*, quanto para *Bos indicus* (WETTEMANN et al., 1972; ADEYEMO; HEATH, 1980). Os teores variaram de valores não detectáveis até 0,37 ng/mL na ocasião do estro e nos dois dias subsequentes. Valores de 4,91 a 6,70 ng/mL foram encontrados entre os dias 13 e 15 do ciclo, em vacas Gir (*Bos indicus*) (MADUREIRA, 1988).

Durante o estro, os teores de P4 mantêm-se sempre <1 ng/mL (ERB et al., 1976). Um dia antes do estro encontra-se $0,43 \pm 0,12$ ng/mL; $0,33 \pm 0,07$ durante o estro e $0,20 \pm 0,06$ dois dias após (WETTEMANN et al., 1972).

Durante os dias em que a P4 mantêm-se alta (acima de 2,5 ng/mL) os teores de LH permanecem inalterados, subindo à medida que as concentrações de P4 diminuem para valores menores de 1,5 ng/mL. A queda na P4 ($< 0,75$ ng/mL) deve ocorrer em

período menor que 32h antes do pico de LH para que ocorram taxas normais de concepção (ERB et al., 1976).

Wiltbank et al. (2006), relacionaram a alta produção leiteira e consumo alimentar com aumento na circulação hepática e maior metabolização dos esteróides, tendo como consequência alterações reprodutivas.

Nos últimos 20 anos, houve uma queda de 20% nas taxas de concepção (WASHBURN et al., 2002), com diminuição no período de duração do estro para menos de 8h (LOPEZ et al., 2005), aumento da incidência de gêmeos (RYAN; BOLAND, 1991) e perdas gestacionais (SANTOS et al., 2004), além de outras alterações nas vacas leiteiras de alta produção.

Uma correlação positiva entre o consumo de matéria seca e o “clearance” de P₄ foi encontrada o que levaria a um aumento nas perdas gestacionais e diminuição nas taxas de concepção (SANGSRITAVONG et al. 2002).

Apesar das alterações citadas serem mais evidentes em vacas leiteiras de alta produção, no presente estudo o foco é o rebanho de corte. Porém esses fatos evidenciam o importante papel da P₄ em todo processo reprodutivo, e o fino balanço entre seus teores plasmáticos, às condições metabólicas e desafios que o animal é submetido, e o sucesso da reprodução.

2.2.3 Teores plasmáticos de P₄ durante tratamento com dispositivos vaginais

Os dispositivos intravaginais são constituídos de uma base de náilon revestida com silicone impregnado de P₄. No mercado existem diversos tipos de implante e cargas iniciais de P₄, a saber: CIDR® - 1,9g de P₄; PRID® - 1,55g de P₄; CRONIPRES® - 1,0 a 1,3g de P₄; DIB® - 1,0g de P₄; SINCROGEST® – 1,0g de P₄ e PRIMER® – 1,0g de P₄.

Os teores plasmáticos de P4 variam nos tratamentos entre os animais, período do ciclo estral, concentração inicial do hormônio presente no dispositivo e utilização ou não de um estrógeno e PGF2 α (MACMILLAN et al., 1991).

Em média, animais ovariectomizados tratados com CIDR® novo (1,9g de P4) alcançam teores de $5,6 \pm 0,1$ ng/mL, indo a $8,7 \pm 0,3$ ng/mL na sexta hora e depois caindo a uma taxa de 0,55 ng/mL entre o D2 e D7 e 0.21 ng/mL do D7 ao D12, e animais ciclando obtiveram média de 4,9 ng/mL durante o tratamento (MACMILLAN; PETERSON, 1993).

Peterson e Henderson (1991) encontraram teores de 6,7 ng/mL em média no primeiro dia após a inserção de um CIDR® novo e de 2,3 ng/mL no dia 15 em vacas ovariectomizadas.

Munro (1987) comparou os teores alcançados pelo dispositivo CIDR® e PRID®, com cargas iniciais diferentes de P4 e estruturas diferenciadas de implante, e concluíram que não houve diferença nestes teores. Em animais sem um corpo lúteo funcional, aumentar a carga hormonal inicial além de 1,9 g não resultou em maiores teores no D15 após inserção do implante (MACMILLAN et al., 1990) e o dispositivo PRID não conseguiu manter teores acima entre 4 e 7 ng/mL após 7 dias mesmo com aumento de 2 para 6,25% (ROCHE; IRELAND, 1981).

Cargas crescentes de P4 resultaram em uma relação quadrática com os teores plasmáticos, assim como a relação entre a carga inicial e a remanescente (MACMILLAN et al., 1990). Uma vez bem estabelecidas estas relações, a manutenção de teores altos o suficiente até pelo menos o 15º dia de tratamento levou naturalmente a pensar-se no reaproveitamento dos implantes (ROCHE et al., 1974).

A reutilização de um implante contendo 1,9g ou 1g de P4 não resultou em diferentes taxas de concepção, sendo, portanto, possível (COLAZO et al., 2004, 2006; CREPALDI, 2010). Teores plasmáticos do implante DIB®, contendo 1g de hormônio, diminuíram gradualmente conforme os dias de tratamento (SANTOS et al., 2004), alcançando 1,56 ng/mL no D16 (PIMENTEL, 2006). Já os teores plasmáticos alcançados pelo CIDR® novo, reutilizado uma ou duas vezes são de 1,2-1,7 ng/mL;

>1 ng/mL e $\leq$ 1 ng/mL, repectivamente. Os tratamentos diferem, portanto, em relação aos teores, e uma interação entre tempo e tratamento ocorre (LONG et al., 2009).

A utilização de um estrógeno, no início do tratamento, leva à luteólise e faz com que os teores plasmáticos, no dia 12 após inserção do implante, sejam similares àqueles encontrados em animais castrados ou tratados com PGF2 α (MACMILLAN; PETERSON, 1993).

2.2.4 Teores plasmáticos de P4 e alterações endócrinas

Estudos conduzidos com o intuito de avaliar os padrões de dominância folicular e indução de cistos são importantes para compreensão dos efeitos dos teores de P4 provindos da reutilização de implantes no sistema endócrino.

Os teores de P4 durante toda fase luteínica bloqueiam o pico de LH (ROCHE; IRELAND, 1981; KESNER; PADMANABHAN; CONVEY, 1982; SAVIO et al., 1993) e quando em altas concentrações, também o padrão pulsátil deste é suprimido (BERGFELD et al., 1995, 1996). Quando os teores de P4 encontram-se entre 1-3 ng/mL, o padrão pulsátil do LH fornece o suporte gonadotrófico necessário ao crescimento do folículo dominante, o que acontece durante a onda folicular pouco antes da luteólise (BERGFELD et al., 1996; KOJIMA et al., 2003).

Duchens e colaboradores (1995) evidenciaram que teores plasmáticos tão baixos quanto 0,3-0,4 ng/mL foram capazes de bloquear a ovulação. Os folículos crescem em tais teores, podendo manter sua dominância por mais de 10 dias (KOJIMA et al., 2003), porém como falham em ovular, pelo bloqueio da P4 ao pico de LH, tornam-se císticos (ROBINSON et al., 2006).

Hatler et al. (2008) observaram uma tendência em haver maior frequência de pulsos de LH conforme as reutilizações do implante CIDR®, ou seja, durante o tratamento com o implante novo, ocorreu menor incidência de pulsos nos períodos de coleta de 8h. As médias dos teores de P4 obtidos para o CIDR® novo ($1,46 \pm 0,11$), reutilizado por 14 dias ($0,87 \pm 0,12$) e 28 dias ($0,58 \pm 0,10$) diferiram.

Picos pré-ovulatórios de LH podem ocorrer naturalmente caso a P4 esteja ao redor de 0,26-0,44 ng/mL, e estes teores não são capazes de suprimir os picos de LH caso sejam induzidos pela administração de estradiol exógeno (cipionato de estradiol) (HATLER et al., 2008).

Folículos que crescem em baixos teores de P4 possuem maior diâmetro, crescem por mais tempo e persistem mais do que aqueles em teores fisiológicos (ADAMS; MATTERI, GINTHER, 1992).

Teores plasmáticos resultantes de reutilizações subseqüentes de implantes de P4 chegam a valores subluteínicos, e, portanto, permitem maior crescimento do folículo dominante durante o tratamento. Isso pode levar à uma ovulação precoce depois da retirada do implante, como evidenciou Crepaldi (2010), o que prejudicaria a posterior taxa de concepção, pela inseminação fora do período de viabilidade oocitária.

2.2.5 Determinação *in vitro* da quantidade de P4 em matrizes poliméricas

A quantidade de P4 liberada *in vitro* por um implante em determinado período pode ser obtida através de técnica descrita por Bunt et al. (1997). Esta técnica foi adaptada da United States Pharmacopeia, originalmente descrita para avaliação de implantes humanos.

Os valores acumulados de hormônio em função do tempo obtidos neste procedimento podem ser adaptados a diversos modelos matemáticos, como, por exemplo, o Zero-order e o First Order, que descrevem a cinética de liberação do fármaco no meio o qual está inserido.

As taxas de passagem dos esteróides são influenciadas tanto por características do silicone do implante (área e espessura) quanto características dos hormônios (polaridade e presença de cadeias laterais) (DZIUK; COOK, 1966).

Quando a técnica descrita por Bunt et al. (1997) é aplicada aos dispositivos intravaginais de P4 confeccionados com polímeros, encontram-se quantidades em

função do tempo que podem ser descritas pela equação de Higuchi (RATHBONE et al., 2002; PIMENTEL, 2006). A quantidade de P4 liberada por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo, no caso deste modelo, gera uma reta, e seus coeficientes angulares identificam a liberação.

Rathbone et al. (2002) obtiveram coeficientes angulares de $1.300 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, aplicando o modelo de Higuchi em blendas de PCL com 10% de P4, valor aproximado ao encontrado no dispositivo CIDR® (1,9g de P4), $1.228.52 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ (BURGGRAAF et al., 1997). Pimentel encontrou valores de $677,39 \pm 16,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ testando o dispositivo DIB®, que contém 1g de P4.

2.3 SINCRONIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL

O controle farmacológico do ciclo estral é baseado na manipulação das regulações endócrinas e alterações hormonais, simulando acontecimentos fisiológicos da fêmea. Garante-se, assim, uma ovulação em momento conveniente e retorno à atividade cíclica de vacas em anestro pós-parto (BALL; PETERS, 2006).

Este controle é baseado em três abordagens principais: Indução da luteólise por agentes luteolíticos, como a $\text{PGF}_{2\alpha}$, eficaz em vacas cíclicas; manipulação de folículos e corpo lúteo pela combinação entre GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$; e administração exógena de P_4 ou seus derivados sintéticos, simulando a função do corpo lúteo, e procedendo à sua retirada abrupta. Este último procedimento é eficiente em induzir a ovulação também em vacas acíclicas. (MADUREIRA; PIMENTEL 2005; BALL; PETERS, 2006; BARUSELLI, et al., 2006).

2.3.1 Progesterona na sincronização do ciclo estral

A administração exógena do P_4 mimetiza seus efeitos biológicos, dentre os quais pode-se citar a supressão do estro, a inibição do pico pré-ovulatório de LH – simula

a fase luteínica do ciclo - e regulação da secreção pulsátil de LH, levando à ocorrência das ondas foliculares e seu desenvolvimento. (LARSON; BALL, 1992).

Para o sucesso na sincronização da ovulação, a adoção de períodos longos de tratamento, entre 18 e 21 dias, deveria ser preconizada. Dessa maneira pode-se evitar que a duração da vida útil do CL ultrapasse o período de exposição ao implante, levando à falha de sincronismo. (BALL; PETERS, 2006).

Porém, foi demonstrado haver baixa taxa de gestação após tais procedimentos (TRIMBERGER; HANSEL, 1955), provavelmente devido à ovulação de folículos persistentes com oócitos de fertilidade reduzida, ou pela inibição do transporte de espermatozóides por alterações no ambiente uterino (ROCHE et al., 1974; WISHART, 1977; BALL; PETERS, 2006).

Devido à isso, deve-se aplicar no início do tratamento, um agente luteolítico / antiluteotrófico, tal qual os estrógenos, e diminuir o período de exposição à P4 para sete à nove dias (WILTBANK, 1961; WOODY; GINTHER, 1968). Além disso, após o tratamento, deve-se aplicar uma dose de prostaglandina F2 α a fim de limitar a exposição à P4 exógena e endógena (ROCHE, 1978).

2.3.2 Estradiol

O Estradiol é capaz de apresentar efeito luteolítico (WILTBANK et al., 1961), conferir efeito sinérgico à P4, uma vez que baixa os teores de LH (impede pico ovulatório), suprime um eventual folículo dominante, e leva à emergência de nova onda folicular (MADUREIRA; BARUSELLI; MARQUES, 2000; MARTINEZ et al., 2000; BÓ; CUTAIA; BARUSELLI, 2004; CAVALIERI, 2004).

A administração de Benzoato de Estradiol (2mg) no momento da inserção do implante de P4 causa emergência de uma nova onda folicular em média 4.3 $\pm$ 0.2 dias (BÓ et al., 1995) e é um dos protocolos mais utilizados para sincronização (MACMILLAN; BURKE, 1996, BÓ et al., 2002).

A aplicação de uma segunda dose de Benzoato de Estradiol (1mg) visa sincronizar o estro e a ovulação (LEMASTER et al., 1999) e é essencial para o sucesso da inseminação, aumentando as taxas de prenhez (COLAZO et al., 1999). Deve ser administrada 24hs após a remoção do implante (MADUREIRA; BARUSELLI; MARQUES, 2000; BÓ et al., 2004).

Devido à menor meia vida deste hormônio, se faz ainda necessária uma aplicação de PGF2 α no momento da retirada do implante, garantindo assim a luteólise (BARUSELLI et al., 2006) e a inseminação deve acontecer de 52 a 56 horas após a retirada (BÓ et al., 2002).

2.3.3 A eCG

A eCG é produto dos cálices endometriais da égua prenhe, produzida do 40º ao 130º dia de gestação. Possui meia vida longa e se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e de LH no corpo lúteo (MURPHY; MARTINUK, 1991).

A utilização da ECG, no momento da retirada do implante de P₄, aumenta o diâmetro do folículo dominante e, conseqüentemente, as taxas de ovulação e concepção à do (BARUSELLI et al., 2006). Este fenômeno ocorre porque a eCG possui ação similar FSH e LH, predominantemente do primeiro (GREGORY; ROCHA, 2004), visto que possui, em sua estrutura química, subunidades α e β , semelhantes aos hormônios hipofisários citados (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Isso se mostra importante frente ao diâmetro médio dos folículos no pós-parto apresentarem-se menores e sofrerem atresia antes de atingir o tamanho ideal para ovular (MURPHY; BOLAND; ROCHE, 1990; YAVAS; WALTON, 2000).

Conseqüentemente, a eCG torna-se útil em vacas/novilhas em anestro pós-parto e/ou baixa condição corporal, resultantes da mamada e/ou consumo insuficiente de nutrientes (RIBEIRO FILHO et al., 2002; BARUSELLI et al., 2004). Porém, em animais com bom escore de condição corporal este hormônio não leva à melhora de

índices reprodutivos, provavelmente devido à alta taxa de ciclicidade, apresentada nestes casos, dispensando seu uso (BARUSELLI et al., 2004).

Em estudo conduzido por Rossa et al. (2009), a associação da eCG ao protocolo de Norgestomet aumentou as taxas de prenhez em animais com <45 dias pós-parto, em relação ao protocolo com Benzoato de Estradiol e controle (solução fisiológica).

2.3.4 Taxas de concepção com reutilização de implantes

A reutilização de implantes de P4 em programas de IATF apresenta resultados variados. A carga inicial de P4 de 1,9g presente no CIDR® permite sua reutilização, porém o terceiro uso já apresenta quedas nas taxas de concepção, quando a IATF é realizada 54h após a retirada do implante (SÁ FILHO et al., 2009, comunicação pessoal). Não ocorrem diferenças nas taxas de concepção quando este implante é utilizado pela segunda vez (BARUFI, 2002).

As taxas de concepção não se alteraram com este mesmo dispositivo previamente usado por 9 ou 18 dias, quando as inseminações ocorreram 48h após a retirada do implante (MENEGETTI et al., 2009). Da mesma maneira, dispositivos com carga inicial de 1g de P4, previamente utilizados por 8 ou 16 dias, não diferiram quanto às taxas de prenhez, quando a inseminação ocorreu 48h após a retirada (MEDALHA et al. 2009).

Em estudo conduzido por Cutaia et al. (2005), as taxas de concepção obtidas com o uso de dispositivos DIB® manufaturados com 1 ou 0,5g de P4 não diferiram.

2.4 PERÍODO PÓS-PARTO

A reprodução desempenha papel chave para o desempenho econômico de um rebanho, sendo cinco vezes mais importante para valores econômicos do que parâmetros produtivos e de produto (TRENKLE; WILLHAM, 1977). Dentro da classe da reprodução tem-se, dentre outros, o intervalo entre partos, e para obtenção de máxima eficiência reprodutiva, este período compreendido entre o parto e uma nova concepção deveria ser de aproximadamente 80 dias, levando assim ao nascimento de um bezerro por vaca por ano (YAVAS; WALTON, 2000).

Para isso é necessário vencer a condição de anestro pós-parto, na qual se encontram aproximadamente 50% das vacas, em início de estação de monta, no Brasil (MADUREIRA et al., 2006) ou até menos (BARUSELLI et al., 2006). Vacas que nela permanecem, durante grande período da estação de monta, concebem apenas ao final desta, e, conseqüentemente, seus bezerros possuirão menor peso e serão mais jovens quando de sua desmama (SANTOS; SÁ FILHO, 2006)

A ausência de um corpo lúteo e o tamanho reduzido dos ovários, além da falta de sinais de estro, durante período de tempo prolongado, caracteriza o anestro pós-parto (WILTBANK et al., 2002; AHUJA et al., 2005; MADUREIRA et al., 2006).

As causas dessa condição incluem sazonalidade, fatores relativos à raça, distocias, presença ou não do touro, palpções uterinas, efeitos persistentes da gestação anterior, e os dois principais fatores: nutrição e amamentação (SHORT et al., 1990; YAVAS; WALTON, 2000).

2.4.1 Alterações hormonais no pós-parto

Na fase final da gestação, a produção de estrógenos placentários aumenta, principalmente de Estradiol (E_2) e P_4 , desencadeadores de um *feedback* negativo no hipotálamo, que leva à baixa liberação de GnRH. Conseqüentemente, no período

pós-parto, os estoques de LH/FSH da hipófise estarão reduzidos (NETT et al., 1988).

Nas cinco semanas que precedem o parto os teores de LH estão muito baixos ou indetectáveis, devido à depleção de seus estoques, e o padrão de ondas de FSH que precede uma emergência folicular não está presente (CROWE et al., 1998). A diminuição abrupta dos teores de E2 e P4 após o parto reinicia as ondas de FSH (GINTHER et al., 1996; CROWE et al., 1998). Os pulsos e o conteúdo hipofisário de LH aumentam, conforme aumenta o período pós-parto, e as concentrações de receptores de GnRH e E2 permanecem sempre altas, assim como não mudam as concentrações plasmáticas de FSH (NETT et al., 1988).

Como não se têm alterações na liberação de FSH (STAGG et al., 1998), o padrão de ondas foliculares reinicia em média $4,0 \pm 0,9$ dias após o parto (GINTHER et al., 1996) e, em aproximadamente 10-14 dias, um folículo dominante pode ser identificado em vacas lactantes (STAGG et al., 1995), porém apenas 11% dos animais ovulam tal folículo (MURPHY; BOLAND; ROCHE, 1990).

Nesta condição anovulatória, existe crescimento folicular até o desvio, porém não há crescimento além de aproximadamente 8mm de diâmetro e nem presença de um CL (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Uma média de 4,2 ondas foliculares ocorre antes da primeira ovulação, em gado de corte criado a pasto, ou $43,4 \pm 5,3$ dias (McDOUGALL et al., 1995).

A retomada da ovulação nas vacas paridas, provavelmente, obedece à “gonadostat theory” de Ramirez e McCann (1963) para a puberdade, onde a elevação de secreção de LH ocorre devido à uma diminuição da sensibilidade do hipotálamo ao E2. Tem-se então aumento na pulsatilidade do LH em função do período pós-parto. Fato verificado por Nett et al. (1988), que encontraram ausência de pulsatilidade aos 15 dias pós-parto, pelo menos um pulso nos animais com 30 dias pós-parto e até 3 pulsos aos 45 dias, durante o período de coleta de 8h, a cada 15 minutos.

A pulsatilidade do LH, resultado da diminuição de receptores de E2 no Hipotálamo, permitirá o crescimento final deste folículo, produtor de E2 (WILTBANK et al., 2001).

O aumento deste último, por sua vez, desencadeará um pico de LH, permitindo a ocorrência da primeira ovulação pós-parto (MADUREIRA et al., 2006).

2.4.2 Ciclos curtos

Sinais de estro não precedem a primeira ovulação (MURPHY et al., 1990) devido a ausência de um pré-estímulo da P4 nos centros cerebrais de comportamento sexual (YAVAS; WALTON, 2000). Em 82% (STAGG et al., 1995) e 78% (MURPHY; BOLAND; ROCHE, 1990) dos animais ocorre um ciclo de menor duração do que o normal, com média de $12,1 \pm 1,2$ dias. e 7-10 dias (ODDE et al., 1980)

Os tamanhos dos folículos nestes ciclos são semelhantes aos de ciclos normais (PERRY et al., 1991) levando ao desenvolvimento de um CL com diâmetro compatível. Os estímulos gonadotróficos estão presentes (GARVERICK et al. 1988), não há diminuição da concentração e da responsividade de receptores de LH neste CL (DUBY et al., 1985; SMITH et al., 1996), sua função é normal (HU et al., 1990) e não há aumento da responsividade à $\text{PGF2}\alpha$ (COPELIN et al., 1989).

A mais provável causa seria a baixa concentração de P4 e E2 que precede a primeira ovulação no pós-parto, levando a um aumento nos receptores endometriais de Ocitocina, favorecendo a ação desta no mecanismo de luteólise (ZOLLERS et al., 1993; MANN; LAMMING, 2000). Este efeito estaria potencializado pela liberação de Ocitocina, proveniente da amamentação (TROXEL; KESLER, 1984; TROXEL; OPSOMER; KESLER, 1984).

2.4.3 Amamentação

No sistema de criação nacional, a amamentação dos bezerros é contínua e a desmama acontece ao redor dos 7 meses de idade. Isso pode ser um dos principais

fatores relacionados ao baixo desempenho reprodutivo de um rebanho (WAGNER; OXENREIDER, 1971).

Após a normalização dos estoques de LH na hipófise, a liberação deste passa a depender da amamentação, uma vez que desmames temporários ou totais aumentam a frequência dos pulsos de LH (MYERS et al., 1989; STAGG et al., 1998) e a concentração de receptores de LH no folículo (WALTERS et al., 1982), comparativamente à vacas que permaneceram com suas crias. Após 45 dias pós-parto, o desmame não mais influenciou na liberação de LH, devido à diminuição da sensibilidade ao efeito supressor da mamada (BELL et al., 1998).

A presença do bezerro e seus estímulos táteis no úbere ou tetos, leva à esta supressão, provavelmente por mecanismos opioidogênicos (WHISNANT et al., 1986). Peptídeos opióides endógenos – encefalinas, endorfinas e dinorfinas – são produzidos a partir da amamentação, e inibem a liberação de GnRH (LESHIN et al., 1991), e, conseqüentemente, LH (MALVEN et al., 1986; CHAO et al., 1986; MYERS, et al., 1989).

Ademais a pulsatilidade do LH é modulada por estrógenos ovarianos, e o estímulo da mamada aumenta a sensibilidade do GnRH ao feedback negativo destes. Esse quadro se modifica conforme o período pós-parto aumenta, e o hipotálamo retorna à sua responsividade normal, elevando a pulsatilidade do LH (GARCIA-WINDER et al., 1984).

Ainda durante a mamada ou contato mãe-filhote, são liberadas ocitocinas (STEVENSON et al., 1994), substâncias que no endométrio levam à produção de PGF2 α , acarretando luteólise e conseqüentemente ciclos curtos no pós-parto (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005).

À mobilização energética, à atividade hormonal diferenciada e aos mecanismos opioidogênicos envolvidos ainda se somam fatores capazes de aumentar o intervalo entre partos. Por exemplo, pode-se citar uma maior ligação maternal entre a vaca e sua cria, maior frequência de mamadas e quantidade de leite consumido, ou seja, fatores individuais dentro de um rebanho (WILTBANK et al., 2002).

Alternativas à desmama, ao redor dos sete meses, seriam as técnicas de desmame precoce ou mamadas interrompidas, controladas. Porém, as desvantagens de manejo, aumento na incidência de doenças nos bezerros e redução de seu peso ao desmame devem ser levados em consideração (SHORT et al., 1990).

2.4.4 Nutrição

Os efeitos da nutrição sobre o anestro pós-parto se dão por muitas variáveis, como quantidade e qualidade do alimento ingerido, reservas corporais adquiridas (SHORT et al., 1990), condição corporal no período do parto e suplementação pré e pós-parto (MADUREIRA et al., 2006).

No terço final da gestação, a exigência nutricional aumenta drasticamente, e os resultados de uma nutrição inadequada, neste período, podem levar a um aumento no intervalo entre partos, pelo prolongamento do anestro (SCHINGOETHE; BYERS; SCHELLING, 1988).

Após o parto, a quantidade de alimento ingerido no início da lactação não consegue suprir as necessidades de energia para manutenção e produção, sendo este consumo ineficiente o mais importante fator afetando a fertilidade (BUTLER; SMITH, 1989; SANTOS; SÁ FILHO, 2006).

Frente ao balanço energético negativo, a partição dos nutrientes ingeridos obedece a critérios de relevância. A manutenção do metabolismo basal, atividade e crescimento possuem prioridade sobre reservas energéticas, prenhez, lactação e ciclo estral (SHORT et al., 1990). Esta condição se apresenta mais evidente em primíparas, devido se encontrarem ainda em fase de crescimento (NRC, 2000).

A má qualidade das pastagens brasileiras contribui para este cenário, e a restrição alimentar no pré-parto leva à perda de peso e diminuição das reservas corporais, culminando com baixo escore corporal (PIRES et al., 2004).

Segundo Randel (1990), o baixo escore não permite que haja utilização de fontes de reserva energética para o início da lactação, sendo que um ECC de no mínimo 5 – escala de 1 à 9 – deve ser preconizado. Isso asseguraria uma reserva de nutrientes adequada a um bom desempenho reprodutivo pós-parto.

A influência do ECC é mais acentuada nas primíparas, pois sofrem mais com o balanço energético negativo no pós-parto. Frente à isso é muito importante manter um escore adequado no momento do primeiro parto (PIRES et al., 2004; WILTBank, 1970).

A influência das suplementações pré e pós-parto. Segundo Wiltbank; Ingals e Zimmerman (1964), quando há uma restrição no consumo energético no pré-parto, há uma queda no ECC e, conseqüentemente, anestro prolongado. Pode-se concluir, portanto, que esta suplementação é decisiva no retorno à atividade cíclica ovariana e desempenho reprodutivo das vacas de corte (SANTOS; AMSTALDEN, 1998).

A suplementação no pós-parto também pode reduzir o tempo para manifestação do estro, caso seja comparado com um grupo sem suplementação, porém os efeitos não são tão pronunciados (WILTBank et al., 1962).

Assim sendo, existe uma inter-relação entre os dois tipos de período de tratamento. Sabe-se que a influência do nível nutricional pós-parto é menor caso haja nutrição eficiente no pré-parto. Por conseguinte, vacas com baixo escore na parição, decorrentes da suplementação inadequada antes do parto, sofrem influência muito positiva ao serem alimentadas eficientemente no pós-parto (DUNN et al., 1969).

A determinação de funções e mecanismos específicos da influência de nutrientes na reprodução é difícil, uma vez que não há substâncias específicas requeridas para tal. Todos os nutrientes estudados também participam de outras funções do organismo (ROCHE; CROWE; BOLAND, 1992; DISKIN et al., 2003).

Pode-se presumir que os efeitos da nutrição atinjam principalmente a síntese de GnRH, a hipófise anterior pela secreção e síntese de LH/FSH e GH – *Growth Hormone* – e nos ovários a regulação do crescimento folicular e síntese de hormônios esteróides (DISKIN et al., 2003).

Aparentemente, a subnutrição acarreta um efeito semelhante ao das novilhas pré-púberes, onde a quantidade de E₂ é inibitória à secreção de GnRH/LH. A ovulação não ocorre porque não há pico destes hormônios ou de estradiol. Esta condição de sensibilidade elevada ao E₂ parece estar diretamente relacionada ao balanço energético do animal (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

O balanço energético negativo diminui as concentrações de glicose, insulina e IGF1 no sangue, e também baixa as concentrações de P4 no plasma (SANTOS; SA FILHO, 2006). Há diminuição da atividade e concentração de leptina, provavelmente o metabólito responsável pela inter-relação entre o estado metabólico do animal e sua capacidade reprodutiva (GONÇALVES et al., 2006).

Todas estas substâncias e hormônios afetam a foliculogênese, ovulação e produção de esteróides (SANTOS; SA FILHO, 2006).

2.4.5 Ações da P4 no pós-parto

A condição de anestro pós-parto pode ser contornada pelo tratamento com progestágenos. O perfil hormonal e seus efeitos na vaca parida são muito semelhantes à novilha pré-púbere, portanto a exposição aos progestágenos é capaz de aumentar a secreção de LH e normalizar o crescimento folicular, desde que o padrão de liberação de FSH esteja presente (GARCIA-WINDER et al., 1986).

Isso ocorre porque nessas duas classes animais existe um *feedback* negativo do E₂ à liberação de pulsos de GnRH, e conseqüente inexistência do padrão pulsátil de LH. O progestágeno ameniza este processo, uma vez que diminui a expressão de receptores de estradiol no hipotálamo (DAY; ANDERSON, 1998), e leva a um aumento no LH, e induz a puberdade ou o retorno à ciclicidade.

Vacas em anestro, submetidas ao tratamento, apresentaram aumento na frequência do LH, tanto em rebanhos leiteiros quanto em rebanhos de corte (RHODES et al., 2002; GARCIA-WINDER et al., 1986). Os folículos nos animais tratados contêm mais receptores para LH, possuem maior peso pelo maior conteúdo de líquido folicular, e

mais E2. Receptores de FSH não apresentam alterações em vacas tratadas e não tratadas (INSKEEP et al., 1988).

A normalização do FSH, logo após o parto, permite que ondas foliculares cresçam normalmente, porém devido à ausência do LH, estas não culminam na ovulação. Esta pode ser induzida pelo GnRH, gonadotrofinas ou estrógenos (DAY, 2004), porém será geralmente seguida de um ciclo curto (WEBB et al., 1980; MURPHY; BOLAND; ROCHE, 1990; DAY, 2004).

Isso ocorre porque baixas concentrações de P4 levam a um aumento na expressão de receptores de ocitocina e diminuição de receptores de P4 no endométrio, permitindo que ocorra um *feedback* positivo precoce entre a ocitocina e a prostaglandina e conseqüente luteólise prematura (ZOLLERS et al., 1993; MANN e LAMMING, 2000). Altas concentrações de E2 aplicadas no meio do ciclo estral induzem a luteólise pelo aumento da produção de PGF2 α (BERTAN et al., 2006).

É esperado, portanto, que a exposição à P4 proveniente de implantes, antes da primeira ovulação, minimize os efeitos supracitados, diminuindo a expressão de receptores de ocitocina no endométrio (PARKINSON; LAMMING, 1990; ZOLLERS et al., 1993), prolongando a duração do CL, que se forma após a primeira ovulação.

Estes acontecimentos estão intimamente ligados à amamentação, que induz liberação de ocitocina (STEVENSON et al., 1994), em uma situação endócrina favorável à ação desta no mecanismo de luteólise supracitado. Quando os estoques de LH já estão reestabelecidos após o parto, a amamentação contribui para a ausência de picos deste, uma vez que aumenta a sensibilidade hipotalâmica ao E2 pela ação de endorfinas, liberadas durante a mamada (YAVAS E WALTON, 2000; LESHIN et al., 1991).

Da mesma maneira que soluciona os problemas envolvidos na presença de ciclos curtos, a P4 diminui a influência da mamada nas alterações do período pós-parto, atuando na dessensibilização exacerbada ao E2 e mecanismo de luteólise (ANDERSON; DAY, 1996).

A melhoria nas respostas a tratamentos em vacas com baixo escore corporal, principalmente quando a eCG é utilizada, ocorre pelo suporte gonadotrófico e

ligação entre os “hormônios metabólicos” – GH, Leptina, Insulina, IGF1 – e os hormônios reprodutivos (MADUREIRA et al. 2005), uma vez que a reprodução não é prioridade na partição de nutrientes ingeridos, sendo então deixada de lado quando do consumo de forragem pobre (SHORT et al., 1990).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão detalhados os procedimentos realizados em cada experimento.

5.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

Experimento realizado *in vitro* com os dispositivos intravaginais Cronipres®.

5.1.1 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Foram realizados dois ensaios com três dispositivos Cronipres® em duplicata, sendo dispositivos de segundo, terceiro e quarto usos. Dispositivos de primeiro uso foram testados em duplicata em um terceiro ensaio. Cada dispositivo constituía uma unidade experimental.

5.1.2 Local

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução – LFER, do Departamento de Reprodução Animal – VRA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, campus de Pirassununga.

As dosagens de P4 foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ-USP).

5.1.3 Dispositivos

Na análise da liberação de P4 foram testados os dispositivos intravaginais Cronipres® novos e em suas três reutilizações, ou seja, implantes já utilizados uma (2° uso), duas (3° uso) ou três vezes (4° uso). Cada implante novo contém 1g de P4, 28 g de silicone inerte e 41 g de veículo q.s.p.. Um anel complementar de P4 foi inserido para cada dispositivo de 3° uso e dois anéis complementares para os dispositivos de 4° uso. Os anéis complementares contêm 0,1 g de P4 e 2,93g de silicone inerte cada, e o fabricante inicialmente indica a colocação de todos os anéis a partir do segundo uso para permitir um terceiro uso.

5.1.4 Metodologia

Utilizou-se um dissolutor de comprimidos (Nova Ética, modelo 299) com 6 cubas de volume 1000 mL, que foram preenchidas com solução álcool-água destilada na proporção 60:40. Em cada cuba foi mergulhado um implante de P4, sendo que cada uso foi testado em duplicata, totalizando 12 implantes nos testes das reutilizações e 4 implantes no teste dos dispositivos novos.

Os dispositivos foram cortados, selados com silicone e secados por 24h. Após isso foram amarrados às hastes giratórias do dissolutor e mergulhados nas cubas para início do experimento. A temperatura da água foi mantida à 38° C com agitação de 150 RPM (BUNTT et al. 1997) durante todo o período. As amostras de 1mL foram coletadas nos tempos 2 minutos, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h da colocação dos implantes nas cubas, filtradas em filtro Millipore® (0,45 µm), acondicionadas em tubos de vidro, tampadas e seladas com Parafilm® e mantidas em geladeira à 4°C, até o momento da dosagem hormonal, que ocorreu quatro dias após o término das coletas em ambos ensaios.

As análises foram realizadas pela técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), composta de fase estacionária (coluna C18 ODS – Shin Pack

CLC ODS, 0,15mm x 6,0 mm $\text{\AA}$) e fase móvel de acetonitrila/água em proporção de 60:40, fluxo de 2mL/min. As amostras foram injetadas automaticamente na quantidade de 20 microlitros, e lidas em comprimento de onda de 240nm. O tempo esperado de retenção da P4 é de 1,6 – 4,4 min aproximadamente. A curva de calibração é preparada com base na mensuração do pico de base e o intervalo de linearidade está entre 0,01 e 54,5 mcg/mL ($R^2 = 0,9999$).

5.1.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo do programa Statistical Analysis System (SAS). Para que fossem submetidos à estatística de inferência, foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo PROC UNIVARIATE, teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo PROC MEANS, teste de Bartlett.

Os dados relativos à liberação por dispositivo foram submetidos à análise de variância pelo do PROC GLM do SAS, com o comando REPEATED, para o fator medidas repetidas no tempo, atentando-se à possibilidade de interação tempo*tratamento.

Os polinômios ortogonais para os nove tempos de coleta foram obtidos pelo PROC IML.

Após isso utilizou-se o PROC REG para gerar uma equação descritiva das liberações de P4 por implante por tempo, testando modelos lineares, quadráticos e desvio, que determinou um valor de R^2 (coeficiente de determinação). Para cada coeficiente angular foi gerado um valor de P pelo PROC GLM. Foram testadas liberações acumuladas ao longo do tempo.

Para averiguar a diferença entre as equações lineares, para os diferentes usos, foi realizado um teste de comparação dos coeficientes angulares, pela interação tempo*tratamento, no PROC GLM. O nível de significância adotado foi de 5%.

5.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS OVARIECTOMIZADAS

Experimento conduzido *in vivo* com vacas ovariectomizadas implantadas com o dispositivo Cronipres®.

5.2.1 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, adicionado de medidas repetidas no tempo, tendo como variável dependente a concentração plasmática de P4. Dispositivos novos e as três possíveis reutilizações do implante foram testados, em triplicata. Cada animal constituiu uma unidade experimental.

5.2.2 Local

Os ensaios foram realizados nos currais de manejo do Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal - CBRA, Departamento de Reprodução Animal – VRA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, campus de Pirassununga.

5.2.3 Animais, Tratamentos e Metodologia

Doze vacas castradas (*Bos indicus* x *Bos taurus*), com predominância de sangue zebuino, receberam um implante vaginal cada, sendo que cada uso do implante foi testado em triplicata.

Implantes de terceiro uso foram acrescidos de um anel complementar de P4 e implantes de quarto uso acrescidos de dois anéis complementares de P4, como descrito no *teste in vitro*. Os dispositivos permaneceram nos animais por oito dias e a colheita de sangue foi realizada em tubos vacuolizados Vacuette®, com EDTA como anticoagulante, nos seguintes tempos: 0 (momento da colocação do implante), 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h e 192h da colocação do implante. As amostras foram mantidas em gelo durante as colheitas e centrifugadas imediatamente após, à 1500g durante 15 minutos à 4°C em centrífuga (Sorvall® RC3 Plus, EUA).

As dosagens de P4 foram realizadas por Rádio-Imuno-Ensaio – RIE, com kit comercial da DPC (Diagnostics Products Corporation, EUA), no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal – VRA, FMVZ-USP, campus de São Paulo

5.2.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS). Normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelo PROC UNIVARIATE, teste de Shapiro-Wilk e PROC MEANS, respectivamente.

Os dados relativos aos teores plasmáticos por animal foram submetidos à análise de variância, pelo do PROC GLM do SAS, com o comando REPEATED, para o fator medidas repetidas no tempo, atentando-se à possibilidade de interação tempo*tratamento. A variável “animal” não foi incluída no modelo.

Os polinômios ortogonais para os tempos de coleta foram obtidos pelo PROC IML.

Para averiguar a diferença estatística, foi utilizado teste t, entre as médias de todos os teores plasmáticos dentro dos diferentes usos (apresenta compatibilidade com as análises de significância da AUC – *Area Under the Curve*). O nível de significância adotado foi de 5%.

5.3 EXPERIMENTO A CAMPO – VACAS PARIDAS

Experimento conduzido a campo em lotes de IATF.

5.3.1 Delineamento experimental

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de IATF, e o tratamento variou de acordo com o número de reutilizações as quais os dispositivos vaginais já haviam sido submetidos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados generalizados, sendo estes formados em função dos escores de condição corporal (ECC) e escores de condição ovariana (CO), após avaliação prévia dos animais quanto a estas variáveis.

5.3.2 Local

O estudo foi conduzido em fazenda situada no município de Aliança do Tocantins – Tocantins (11°09'55.95''S, 48°41'23.60''O), durante a estação de monta 2009-2010 e 2010-2011. As pastagens são formadas em sua maioria por *Andropogon gayanus*. em região de vegetação denominada Centro-sul e Leste, onde predomina o cerrado e algumas variações de Floresta Estacional Decidua, e situadas na Sub-bacia do rio Tocantins, com clima subúmido ou estacionalmente seco, com médias de temperatura de 24°C - 25°C, chuvas de outubro a abril e período de estiagem de maio a setembro.

5.3.3 Animais

Foram utilizadas 763 vacas paridas da raça Nelore ou cruzadas Nelore x Simental. Todas estavam sob regime de pastejo e mineralização *ad libitum*, em pastagem composta por *Andropogon gayanus*. Os animais foram avaliados quanto ao escore de condição corporal (ECC, variação de 1-9 segundo RICHARDS et al. 1986) e ciclicidade (CO, vacas 1 – ciclando e vacas 2 – não ciclando, segundo MADUREIRA; PIMENTEL, 2006) dentro de cada lote, para que assim fossem equitativamente distribuídos os tratamentos. A idade dos bezerros foi classificada entre três grupos, de 40-60, 61-90 e >90 dias, sendo homogênea dentro de cada lote. Os animais também foram classificados quanto ao grau de sangue.

5.3.4 Tratamentos

Todos os animais receberam implante vaginal de P4 (Cronipress®) e injeção IM de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Cronibest®) no D0 (início do protocolo). No D8 foram retirados os implantes, e aplicados de 1,5mL de eCG (300UI)(Novormon®) e 2mL de PGF2α (Croniben®). No D9 foi aplicada injeção contendo 1mg de Benzoato de Estradiol (Cronibest®). A IATF foi realizada 24 horas após (Figura 1).

Figura 1 - Protocolo de IATF utilizado

A variação no tratamento se deu quanto ao número de vezes as quais os dispositivos foram utilizados, caracterizada a seguir:

- CR1 – Cronipres® novo (1º uso);
- CR2 - Cronipres® já utilizado uma vez (2º uso);
- CR3 - Cronipres® já utilizado duas vezes, com adição de um anel de P4 (3º uso);
- CR4 - Cronipres® já utilizado três vezes, com adição de dois anéis de P4 (4º uso).

Três touros foram utilizados. Cada lote recebeu apenas sêmen de um animal, da mesma partida, e os lotes um e dois foram inseminados com o mesmo touro. Avaliações prévias foram feitas quanto a vigor e motilidade, apresentando resultados satisfatórios.

O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 a 35 dias em todos os lotes, por ultra-sonografia (Chison 600VET, transdutor linear de 5 MHz, China). Todos os lotes foram equitativamente distribuídos em 4 grupos para receber cada um dos 4 tipos de implante.

5.3.5 Lotes

Características dos lotes:

- Lote 1 (n=207) continha vacas paridas primíparas (n=14) e multíparas (n=193) Nelore e Nelore x Simental, com idade variando de 2-17 anos. A idade dos bezerros era de 40-60 dias.
- Lote 2 (n=193) continha vacas paridas multíparas Nelore e Nelore x Simental, com idade variando de 4-10 anos. A idade dos bezerros era de >90 dias.
- Lote 3 (n=170) continha vacas paridas primíparas (n=3) e multíparas (n=167) Nelore e Nelore x Simental, com idade variando de 2-14 anos. A idade dos bezerros variou de 60-90 dias.

- Lote 4 (n=193) continha apenas vacas paridas multíparas Nelore e Nelore x Simental, com idade variando de 2 a 14 anos. A idade dos bezerros variou de 40-60 dias.

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa SAS (Statistical Analysis System), submetidos ao teste de análise de variância PROC GLIMMIX. Como causas de variação, os efeitos de tratamento (dispositivo), fazenda, lote, escore de condição corporal, escore de condição ovariana, grau de sangue e dias de parida foram avaliados. Estes foram sendo eliminados do modelo quando apresentavam um $P > 0.2$, sendo o modelo final composto por dispositivo, grau de sangue e lote.

6 HIPÓTESES

As hipóteses levantadas para os três experimentos serão descritas.

6.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

As liberações de P4 obedecerão a um mesmo padrão em todos os usos do implante conforme o tempo.

As quantidades de P4 liberadas irão diferir e obedecerão uma queda linear conforme as reutilizações.

6.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS CASTRADAS

Os teores plasmáticos de P4 serão sempre maiores quanto menos utilizações os implantes sofreram, e estarão abaixo de 1ng/mL na terceira e quarta reutilização.

Os teores plasmáticos em relação ao tempo obedecerão a equações quadráticas, serão maiores no início para todos os tratamentos, passarão por um platô e cairão novamente.

6.3 EXPERIMENTO A CAMPO – VACAS PARIDAS

As taxas de concepção irão diminuir linearmente conforme os usos do implante, sendo menores para 3° e 4° usos do que para 1° e 2° usos.

Haverá interação entre tratamento e escore de condição ovariana e tratamento e escore de condição corporal com relação às taxas de concepção.

As variáveis lote, grau de sangue e dias de parida não influenciarão no resultado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados nesta seção.

7.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

No presente experimento, para quantidade acumulada de P4, segundo dispositivo, em função do tempo, houve interação tempo * tratamento ($P=0,0002$). A liberação de P4 diferiu ($P=0,0152$) conforme os subseqüentes usos dos implantes Cronipres® e também em relação ao tempo ($P<0.0001$).

Os resultados de quantidade acumulada de P4 em função da raiz quadrada do tempo estão demonstrados na tabela 1.

As quantidades de P4 liberadas podem ser descritas por modelos quadráticos, com P valores altamente significativos (Gráfico 1).

Tendo em vista que as liberações de um fármaco em matrizes de silicone são dependentes da área e das cargas iniciais deste fármaco (RATHBONE et al., 2002), a equação de Higuchi pode ser aplicada aos dados, levando em consideração a liberação de P4 pela área do implante em função da raiz quadrada do tempo.

Gráfico 1 – Quantidade acumulada de P4, segundo tempo conforme reutilizações dos implantes de P4. ♦ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso.

A equação que descreve esta maneira de apresentação dos dados gera uma reta. A P4 está homogeneamente distribuída na camada de silicone de um implante novo, diminuindo sua carga em relação à profundidade da camada de silicone conforme o tempo de uso. O hormônio é liberado por difusão, gerando zonas de depleção no implante, o que caracteriza a liberação por difusão e permite adequação ao modelo de Higuchi (RATHBONE et al., 2002) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Quantidade acumulada de P4 (mg) em função da raiz quadrada do tempo. ◆ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso.

A quantidade de P4 acumulada do dispositivo novo alcançou sempre maiores valores do que as dos implantes reutilizados, sendo essa diferença caracterizada pelo maior coeficiente angular da reta. O dispositivo de segundo uso manteve-se com liberações intermediárias, enquanto os de terceiro e quarto usos não diferiram entre si quanto às liberações, sendo estas menores do que as do implante novo e de segundo uso.

Tabela 1 – Quantidade acumulada de P4 conforme os usos subseqüentes do implante Cronipres® em função da raiz quadrada do tempo, e valores de P para os modelos matemáticos testados - Pirassununga – SP, 2011

TEMPOS							
Trat.	0,181659021	1,414213562	2	2,828427125	3,464101615	4,898979486	6,92820323
C1	205,60 ±0,97	372,35 ±4,10	427,98 ±8,61	481,01 ±18,99	543,22 ±43,22	669,49 ±47,33	835,04 ±54,19
C2	55,12 ±3,11	131,04 ±7,21	163,46 ±10,04	204,28 ±13,91	237,04 ±16,68	307,88 ±25,32	387,67 ±36,60
C3	32,87 ±4,31	75,42 ±10,59	101,57 ±17,73	136,09 ±30,62	162,78 ±38,02	218,93 ±60,13	278,64 ±84,22
C4	52,70 ±0,95	97,44 ±5,20	123,09 ±10,50	156,70 ±16,06	183,12 ±20,60	236,65 ±30,07	294,87 ±47,32

P VALORES					
Trat.	8,485281374	9,797958971	L	Q	D
		1020,55			
C1	975,97 ±61,04	±25,51	<0.0001	0,0002	0,0504
C2	434,53 ±44,80	466,01 ±43,36	<0.0001	<0.0001	0,0235
C3	312,77 ±96,71	332,19 ±99,18	<0.0001	0,0097	0,2125
C4	327,75 ±53,74	345,72 ±56,06	<0.0001	<0.0001	0,0418

Nota: Trat. - tratamento; C1 – implante novo; C2 - implante de 2º uso; C3 – implante de 3º uso e C4 – implante de 4º uso; C.V. - coeficiente de variação; L - linear; Q - quadrático; D - desvio do quadrático. Dados em médias (mg de P4) ± EPM

Os coeficientes angulares são indicativos da quantidade de P4 que é liberada conforme aumenta a unidade de tempo, e dentro de equações lineares são os fatores para análise de inferência estatística.

Podemos atestar que diferenças de comportamento em relação à quantidade de P4 liberada, existem entre os tratamentos pelo valor significativo da interação tempo*tratamento obtido. Justamente este valor demonstra que os coeficientes angulares diferem e, portanto, os tratamentos diferem quanto à P4 liberada em relação ao tempo.

O valor obtido para o coeficiente angular do implante Cronipres® novo (84,127 mg), transformado em μg e dividido pela área aproximada do implante (120 cm^2) resulta em um valor de $701,42\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, taxa de liberação bastante semelhante à encontrada por Pimentel (2006) para o dispositivo DIB® ($677,39\pm 16,13\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$) que contém a mesma carga inicial de P4 (1g).

No uso subsequente do Cronipres®, este valor caiu para $354,95\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, e não diferiu para o terceiro e quarto usos ($260,75$ e $267,90\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ respectivamente). Pode-se verificar que a adição de dois anéis de P4 no implante de quarto uso levou a uma liberação que não diferiu estatisticamente da do implante de terceiro uso acrescido de um anel.

Existe uma correlação positiva entre a carga inicial de P4 contida nos implantes e a liberação (até que haja saturação da matriz na manufatura). Além disso, o tipo de liberação por difusão, como escrito anteriormente, leva à formação de áreas vazias dentro da matriz para onde o hormônio ainda não migrou no processo de movimentação do fármaco. Isso aumenta o tempo de difusão devido à distância a ser percorrida (RATHBONE et al., 2002).

Em relação às quantidades parciais liberadas também ocorreu interação tempo*tratamento ($P<0,0001$), houve efeito de tratamento ($P=0,0014$) e de tempo ($P<0,0001$).

As liberações parciais de P4 (Gráfico 3) do implante novo, de segundo e quarto uso obedecem funções cúbicas (P valores significativos, respectivamente, de 0,0274; 0,0141 e 0,0137) . Ou seja, em determinado momento ao longo do tempo, ocorre

uma menor queda na liberação do hormônio. Pode-se notar que isto ocorre para todas as reutilizações ao redor das 72h, o que poderia ser explicado pela característica de liberação descrita acima.

Para implantes de terceiro uso, a função melhor ajustada é a quadrática (P valor de 0,0030), e pode-se supor que a adição de apenas um anel de P4 tenha alterado o perfil de liberação.

Gráfico 3 – Liberações parciais de P4 ao longo do tempo. ♦ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso

Dados similares de quantidade de P4 foram obtidos em experimento conduzido por Gomes et al. (2010), para o primeiro e segundo usos do implante Cronipres®. As liberações parciais do terceiro uso acrescido dos três anéis (indicação inicial do fabricante) são semelhantes às do segundo uso.

McPhee et al. (1983), utilizaram duas técnicas para esterilização de implantes PRID®, a autoclavagem ou óxido de etileno. No primeiro procedimento, a temperatura chega à 121°C e uma pressão de 100 KPa e obtem-se a esterilização

pelo do vapor de água. Já o segundo método é um procedimento de esterilização química, não envolvendo aumentos de temperatura ou pressão.

Os autores acima citados verificaram que após a autoclavagem, havia deposição de cristais de P4 na superfície do implante o que não ocorreu no procedimento em que foi utilizado o óxido de etileno.

O mesmo ocorreu em experimento com o implante CIDR® (ZULUAGA; WILLIAMS, 2008). Especula-se que conforme ocorre um aumento na temperatura, as interações entre o solvente e o soluto aumentam, e ao chegarem à determinada temperatura acabam vencendo as forças moleculares entre soluto-soluto e solvente-solvente, flexibilizando a molécula e aumentando o coeficiente de difusão desta na matriz (LIU et al., 1985).

Essas constatações podem ajudar a evidenciar a presença de lacunas de P4 conforme o tempo de utilização do implante aumenta, uma vez que quando não há influência térmica, a liberação do fármaco é menor (McPHEE et al., 1983; LIU et al., 1985).

A liberação inicial de P4 nos testes *in vitro* cai conforme os usos, porém tem-se um mesmo padrão descritivo para as liberações. Isso pode ocorrer porque durante o prévio uso dos implantes nas vacas não é formada a zona de depleção descrita *in vitro*.

A droga migra na matriz quando inserida na cavidade vaginal pelo mecanismo de ordem zero, ou seja, o hormônio sempre está presente na interface subsequente àquela que liberou o fármaco, mantendo assim uma concentração saturada, porém dependente da liberação que já ocorreu anteriormente, e portanto, menor ao longo do tempo (RATHBONE et al., 2002).

Isso acontece porque a difusão é lenta, e ocorre uma mistura entre o mecanismo de ordem zero e o modelo de Higuchi. Podemos ter uma liberação governada pela raiz quadrática do tempo no início da liberação, com maior rapidez de difusão, e apenas pelo tempo para tempos mais longos (PAUL, 2010).

7.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – VACAS CASTRADAS

Para teores plasmáticos de P4, segundo ordem de uso do dispositivo, em função de tempo, ocorreu uma interação entre tempo e tratamento ($P < 0,0001$). Os teores plasmáticos obtidos diferiram em relação ao tratamento ($P = 0,0007$) e tempo ($P < 0,0001$). Ou seja, existe uma dependência dos teores com relação ao tempo conforme os tratamentos.

A aplicação de um modelo de equação para descrever os teores *in vivo* de P4 é difícil, pois não se tem controle de todas as variáveis que afetam estes teores. Maiores teores podem ser notados nas primeiras horas subsequentes à inserção do implante, e depois uma queda constante (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Teores plasmáticos de P4 em função tempo. ♦ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso.

Pode-se verificar pelas variações dos teores que a inferência dos dados por equações é difícil neste caso. Para evidenciar as diferenças conforme os tratamentos do implante, pode-se utilizar a AUC- *area under the curve*, ou um teste t

para as médias de todos os teores dentro de um mesmo tratamento, que vai gerar a mesma resposta estatística da AUC (Tabela 2).

Nota-se que o implante de primeiro uso promoveu teores acima de 2 ng/mL durante praticamente todo o tratamento. Os valores obtidos para o primeiro uso estão em conformidade com os obtidos em estudo com o implante DIB®, que levou a teores de $4,5 \pm 0,75$ ng/mL nas primeiras 24h e $2,6 \pm 2,0$ ng/mL após 8 dias de tratamento (VALENTIM, 2004). Estes teores são importantes para garantir o sucesso da sincronização da ovulação ao final do tratamento da IATF.

Todos os tratamentos alcançaram teores satisfatórios durante as primeiras horas da inserção dos implantes, atingindo valores acima de 2,5 ng/mL, o que não permite grandes alterações no LH (ERB et al., 1976). No entanto a partir das 24h os implantes reutilizados atingem teores compatíveis com aqueles alcançados em animais no pró-estro ($2,16 \pm 0,49$) (WETTEMANN et al., 1972) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Teores plasmáticos de P4 durante as primeiras 24 horas após inserção dos implantes novos e reutilizados. ♦ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso

Sabe-se que, durante este período do ciclo estral, ocorre um aumento na secreção de LH devido às concentrações mais baixas de P4, terminando assim o crescimento folicular e permitindo a ovulação.

A partir das 12h da inserção do dispositivo ocorre uma diminuição gradual mais evidente nos teores plasmáticos obtidos para todos os tratamentos.

Tabela 2 – Teores plasmáticos de P4 conforme os usos subseqüentes do implante Cronipres® ao longo do tempo – Pirassununga – SP - 2011

Trat.	TEMPOS										
	0	2	4	6	8	10	12	24	48	72	96
C1	0,98±0,53	7,37±0,71	7,31±0,41	7,39±0,31	7,63±0,39	6,74±0,69	6,94±0,68	5,81±0,23	5,16±0,61	4,03±0,37	3,50±0,37
C2	0,18±0,05	5,69±0,29	4,77±0,47	4,89±0,12	4,55±0,42	4,94±0,51	4,42±0,43	2,78±0,32	1,83±0,40	1,74±0,48	1,33±0,23
C3	0,29±0,08	4,46±0,24	3,67±0,30	3,27±0,25	3,26±0,37	2,68±0,21	2,55±0,21	1,39±0,09	1±0,13	0,85±0,00	0,59±0,08
C4	0,19±0,06	3,14±0,08	2,61±0,00	2,54±0,28	2,43±0,05	2,25±0,11	2,40±0,01	1,82±0,35	1,37±0,35	1±0,21	0,73±0,17
Trat.	120	144	168	192	Média						
C1	3,22±0,27	3,25±0,44	2,86±0,45	1,94±0,27	4,94 ^a ±0,34						
C2	1,01±0,14	0,85±0,14	0,87±0,16	0,80±0,21	2,71 ^b ±0,30						
C3	0,62±0,06	0,56±0,01	0,47±0,03	0,45±0,05	1,68 ^c ±0,21						
C4	0,81±0,15	0,73±0,07	0,57±0,09	0,5±0,06	1,38 ^c ±0,15						

Nota: Trat. - tratamento; C1 – implante novo; C2 - implante de 2° uso; C3 – implante de 3° uso e C4 – implante de 4° uso; EPM – Erro Padrão da Média. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença pelo teste t (P≤0,05).

Ao final do tratamento, no tempo 192h, o implante novo manteve teores superiores a 1,6 ng/mL. Para o 2º uso, nos últimos 3 dias de tratamento, estes valores já eram mais baixos do que o desejado, enquanto que as outras duas reutilizações já apresentavam teores plasmáticos ≤ 1 ng/mL a partir do terceiro dia de tratamento (Gráfico 6). Valores semelhantes foram encontrados por Gomes et al. (2010) testando implantes novos, de segundo e terceiro usos (este último acrescido de 3 anéis complementares de P4). Os teores obtidos a partir das 120h de tratamento foram, praticamente, os mesmos para o segundo e terceiro usos (abaixo de 1 ng/mL).

Estes valores são diferentes daqueles encontrados por Maio et al. (2008), em que dispositivos novos contendo 1 g de P4 e duas reutilizações (8 dias de tratamento cada) foram eficientes na manutenção de teores acima de 1 ng/mL. Novilhas ovariectomizadas foram utilizadas no experimento citado.

Gráfico 6 – Teores plasmáticos de P4 de 24-196 horas após inserção dos implantes novos e reutilizados em função do tempo. ♦ Implante novo, ■ 2º uso, ▲ 3º uso, ● 4º uso

No presente estudo e naquele conduzido por Gomes et al. (2010) os animais utilizados eram vacas ovariectomizadas, e provavelmente as diferenças nos teores obtidos provenham deste fato, uma vez que a unidade experimental diferiu bastante entre os estudos.

Santos et al. (2004), revelaram que o dispositivo DIB® foi capaz de manter concentrações séricas acima de 1 ng/mL por 13 dias, enquanto que o dispositivo CIDR® manteve estas concentrações por 25 dias. As cargas iniciais de P4 nestes implantes são de 1 e 1,9g, respectivamente.

Pimentel (2006) encontrou valores de 1,56 ng/mL após 16 dias de tratamento com o dispositivo DIB®. Estes valores evidenciam que implantes contendo 1 g de P4 poderiam ser reutilizados.

Como o implante Cronipres® contém a mesma carga inicial do DIB®, este poderia ser reutilizado, mantendo os valores plasmáticos de P4 desejados, para o sucesso da sincronização da ovulação.

Como ao final de aproximadamente duas semanas o dispositivo que contém 1 g de carga inicial leva a valores muito próximos de 1ng/mL, adicionar certa dosagem de hormônio poderia permitir uma terceira reutilização do implante. Para tal propósito, o implante Cronipres® contém 3 anéis de silicone complementares contendo cada um 0,1g de P4.

Adicionando os três anéis, os teores plasmáticos encontrados mantêm-se estatisticamente iguais aos obtidos pelo implante de primeiro uso até as 72h de tratamento, quando passa a diferir do primeiro uso, passando a equivalência com o segundo uso, porém os teores alcançados são subluteínicos (GOMES et al., 2010).

Alguns estudos avaliaram a possibilidade de reutilização de implantes de P4 após a esterilização destes por métodos de autoclavagem ou gás.

Estudo conduzido com o implante PRID® - 1,38g de P4 - reutilizado duas vezes após tratamentos de 12 dias mostrou que o implante foi capaz de manter teores plasmáticos acima de 1ng/mL, no terceiro uso, até o D11, apesar de apresentar do pico inicial de P4 ser de aproximadamente 4 ng/mL. Neste caso o método de esterilização foi o gás e os teores foram diferentes entre as reutilizações e o implante novo.

Neste mesmo estudo, ocorreu uma diferença nos teores plasmáticos quando o implante reutilizado foi submetido à autoclavagem. Neste caso os perfis dos teores

provenientes das reutilizações do implante foram comparáveis àqueles dos implantes novos.

A queda nos teores após o platô, para as reutilizações, não é tão evidente quanto à do implante novo, qualquer que seja o método de esterilização (McPHEE et al., 1983).

Cerri et al. (2009), avaliaram os teores plasmáticos de P4 do CIDR® contendo 1,38g em vacas de leite. Foi testado o dispositivo novo e o dispositivo de segundo uso autoclavado. Os teores plasmáticos foram, em média, maiores para o segundo uso autoclavado, porém em ambos tratamentos, os teores foram subluteínicos ($<1\text{ng/mL}$).

Deve-se levar em conta que existe uma diferença de teores plasmáticos atingidos entre animais, para uma mesma concentração de P4 nos implantes. Macmillan e Peterson encontraram variações entre 4,2 e 7,2 ng/mL em animais tratados com CIDR®. Os dispositivos após o tratamento continham o mesmo valor residual de P4 e, portanto, especula-se que isso decorra das diferentes taxas de metabolização entre animais e não de diferentes liberações.

Maiores variações individuais ocorrem quanto mais elevada a carga inicial do implante. Esse fato foi observado tanto no presente estudo, quanto no conduzido por Van Cleeff et al. (1992), com vacas ovariectomizadas tratadas com CIDR novo ou de segundo uso. Provavelmente, teores mais elevados, em vacas castradas principalmente, estejam no limiar da capacidade de metabolização, enquanto que implantes com menor carga de P4 permaneçam bem abaixo deste limiar.

Turino et al. (2010) aplicaram diversos tipos de modelos cinéticos para explicar o metabolismo da P4 em vacas em lactação. O melhor modelo, avaliado pela menor soma de quadrados do resíduo e maior valor de F calculado, foi o hiperbólico.

Esse modelo evidencia diferenças na metabolização da P4 conforme o teor plasmático, sendo que para teores até 15 ng/mL existe um metabolismo menor do que o esperado em uma cinética normal (TURINO et al., 2010). Assim sendo, além de ter variações entre animais, há de se evidenciar a importância da variação no metabolismo de esteróides, dentro de animal, conforme o teor plasmático.

Deve-se levar em conta que o presente estudo possui um modelo animal notavelmente diferente de vacas leiteiras de alta produção, porém a variação hiperbólica, provavelmente, ocorra da mesma maneira, em menores teores.

Em estudos conduzidos em seres humanos, verificaram-se maiores teores plasmáticos provindos da administração i.m. de P4 do que pela via vaginal. Porém, os teores endometriais desta última via eram consideravelmente maiores (MILES et al., 1994; CICINELLI et al., 2000).

Este “mecanismo de primeira passagem uterino”, reportado em humanos, aplica-se a um modelo de distribuição e metabolismo também em vacas, onde apenas uma pequena porcentagem da P4 liberada de um implante atinge a circulação sistêmica, e o restante é transportado diretamente ao útero, pelo mecanismo de contra-corrente entre veias e artérias útero-vaginais (MARIANO et al., 2010).

As concentrações de P4 circulantes podem influenciar a absorção da P4 provinda do dispositivo neste mecanismo, uma vez que este depende da variação de concentração do hormônio entre a veia e a artéria uterina. Logo, animais com maior P4 endógena circulante no sistema porta-uterino absorveriam menos P4 provinda do sistema venoso (absorvida da cavidade vaginal) (CICINELLI, 2008; MARIANO et al., 2010).

A existência desse mecanismo de primeira passagem uterino leva a maiores concentrações de P4 no útero e tecidos adjacentes, levando à ocorrência das ações locais desta, sem que haja variações correspondentes nos teores plasmáticos (CICINELLI, 2008).

Carvalho et al.(2008) demonstrou haver diferença entre os teores plasmáticos de animais europeus, cruzados e zebuínos. Neste último grupo, os teores são mais elevados após a colocação de implante contendo a mesma quantidade de P4. Isso se deve ao fato da taxa de metabolização ser mais baixa nestes animais. Os teores alcançados após 3 dias de tratamento foram a 8,4 ng/mL e caíram a 6,9 ng/mL após 8 dias de tratamento

7.3 EXPERIMENTO A CAMPO – VACAS PARIDAS

Em relação às variáveis escores de condição corporal, períodos pós-parto e ciclicidade, não houve efeito principal e nem interação com tratamento, para a variável resposta taxa de concepção.

No modelo final permaneceram as variáveis grau de sangue ($p=0,11$), lote ($p=0,14$) e tratamento ($p=0,19$) como efeitos principais. A título de efeito ilustrativo, os gráficos para estas variáveis foram plotados.

Não ocorreu diferença significativa na taxa de concepção com relação ao grau de sangue dos animais (Nelore (46,79% 204/436) ou cruzadas Nelore x Simental (51,99% 170/327)($p=0,11$).

A dinâmica folicular em zebuínos e taurinos parece ser semelhante, com ocorrência de 2-3 ondas foliculares, variando de animal para animal (CASTILHO et al., 2007; GINTHER et al., 1996). Algumas vacas zebuínas, no entanto, apresentam até 4 ondas (FIGUEIREDO et al., 1997; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003).

O intervalo entre ovulação e seleção do folículo dominante não difere muito entre as espécies, sendo que Castilho et al. (2007), verificaram 2,7 dias, valor próximo ao encontrado por Sartorelli et al. (2005) em *Bos indicus* e por Bergfelt et al. (2003) em *Bos taurus* – 2,2 a 2,8 dias.

Os diâmetros máximos alcançados pelos folículos dominantes são menores em animais zebuínos, assim como o tamanho dos corpos lúteos, provavelmente devido à menor secreção de LH nestes animais (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003).

Os intervalos entre os sinais de cio e a ovulação são parecidos nas duas espécies – aproximadamente 27 horas - apesar da duração do estro tender ao menor tempo em *Bos indicus* (MIZUTA, 2003), totalizando 10 horas (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003). A intensidade do estro (aceitação de monta) variou entre as espécies em trabalho conduzido por Ahuja et al. (2005), porém não variou em outro trabalho (MIZUTA, 2003).

As taxas de concepção não diferiram em estudo conduzido com animais cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus* (SÁ FILHO et al. 2010). No entanto, em estudo retrospectivo esta diferença aparece, sendo as taxas para animais *Bos taurus*, *Bos indicus* e cruzados, em uma mesma propriedade, respectivamente de 61,7%, 48,3% e 50,7% (SÁ FILHO et al., 2009). A existência ou não de diferença entre as taxas de concepção nas diferentes raças provavelmente está associada à fatores intrínsecos de manejo, em cada propriedade, mais do que a influência da raça em si.

Não houve diferença significativa na taxa de concepção conforme os lotes ($p=0,14$), sendo lote 1 (48,8%, $n=207$), lote 2 (53,4%, $n=193$), lote 3 (55,9%, $n=170$) e lote 4 (38,9%, $n=193$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Taxa de concepção em função dos lotes. Os tratamentos foram igualmente distribuídos dentro de lote ($p=0,14$)

Não houve diferença estatística entre as taxas de concepção obtidas em função da variável preditora tratamento (usos subseqüentes dos implantes Cronipres®) (Gráfico 8).

As taxas de concepção obtidas para implantes novos e de 2º uso foram compatíveis, porém um pouco menores numericamente, àquelas da literatura para o mesmo protocolo de IATF. Crepaldi (2010), utilizando dispositivo contendo 1g de P4, obteve taxa de 59,9% e 53,3% para primeiro e segundo usos respectivamente.

Gráfico 8 – Taxas de concepção em função dos usos subsequentes do implante Cronipres® (1- implante novo; 2 – implante de 2º uso; 3 – implante de 3º uso e 4 – implante de 4º uso) (p=0,19).

A hipótese de que as taxas de concepção difeririam conforme os usos do implante Cronipres® não foi confirmada.

Crepaldi (2010) não verificou diferença estatística entre as taxas de concepção de grupos inseminados de manhã ou à tarde com dispositivo DIB® de segundo uso. As taxas obtidas foram de 61,1%, para inseminações de manhã e 53,2% para inseminações à tarde. Neste mesmo estudo, em outro experimento, o autor não observou maiores dispersões nas ovulações, conforme a reutilização dos implantes, porém, esta foi verificada de 12/12h.

Já na reutilização do implante CIDR®, houve tendência à diminuição da taxa de concepção conforme os usos quando a inseminação ocorreu 54h após a retirada dos implantes. Colazo et al. 2003 encontraram diferenças nas taxas de concepção entre primeiro e segundo usos do CIDR®. O mesmo não foi observado quando as inseminações ocorreram 48h após a retirada, porém houve uma queda na taxa obtida para o implante de primeiro uso (SÁ FILHO, 2009).

Existe uma relação inversa entre os teores plasmáticos de P4 e o diâmetro do folículo dominante (ADAMS; MATTERI; GINTHER, 1992). Caso a P4 diminua na circulação enquanto um folículo dominante está presente no ovário, este caminhará para a ovulação (LUCY et al., 1992).

Ocorre uma maior pulsatilidade do LH quando existe uma queda nos teores de P4, o que favorece o crescimento do folículo (SAVIO et al., 1993; STOCK; FORTUNE, 1993). Em estudo conduzido por Carvalho et al. (2008), os teores plasmáticos de P4 em novilhas tratadas com PGF2 α , no início do protocolo de IATF, não diferiram estatisticamente daquelas não tratadas, porém o diâmetro do folículo foi maior no grupo tratado com PGF2 α no D9 (o implante foi retirado no D8).

Neste mesmo estudo, as ovulações tenderam a ocorrer mais cedo nos animais tratados com PGF2 α , assim como estudo conduzido por Sales et al. (2009) (dados não publicados), em que diferenças de até 5 horas ocorreram entre as ovulações, com dispositivos novos ou de 3º uso.

A amplitude dos picos de FSH e LH não se alteram pela diminuição dos teores de P4, porém o número de picos de LH é significativamente maior quando esses teores permanecem mais baixos que 1ng/mL (IRELAND; ROCHE, 1982; HATLER et al., 2008).

Espera-se que um implante seja capaz de manter teores plasmáticos acima de 1 ng/mL, uma vez que este é o teor limite em um ciclo estral normal, para animais dentro da fase luteínica. A reutilização dos implantes leva à quedas nos teores plasmáticos de P4, conforme pode ser evidenciado no experimento 2, do presente estudo, a teores menores do que 1 ng/mL.

Pegorer et al. (2011) constataram maiores diâmetros foliculares em novilhas submetidas a IATF com implantes contendo menor carga inicial de P4, porém não

houve diferença nas taxas de concepção. Da mesma maneira, Lüttenau et al. (2011) encontrou maiores diâmetros foliculares nos animais que possuíam menores teores plasmáticos de P4. Animais com folículos maiores apresentam maior taxa de concepção (SÁ FILHO et al., 2010).

Hatler et al. (2008) demonstraram que a P4, mesmo em níveis subluteínicos é capaz de conter um pico pré-ovulatório de LH, e não houve diferença estatística entre a ocorrência de ovulação, durante o tratamento de 14 dias com CIDR® novo, já usado por 14 dias ou 28 dias. No entanto neste último, em 3/7 animais testados ocorreu um pico de LH ao redor do D3 e posterior ovulação.

Houve tendência de um aumento na pulsatilidade do LH entre o dispositivo novo e o usado 14 ou 28 dias (corresponderiam aproximadamente a um terceiro e quinto usos).

Em trabalho conduzido por McPhee et al. (1983), observou-se uma maior dispersão da porcentagem de animais ovulados conforme o tempo, para o 3º uso do implante PRID®, mesmo sendo este submetido ao processo de autoclavagem. A distribuição foi menos dispersa para implantes de 2º uso, seguida de implantes de 1º uso.

Porém, neste mesmo estudo, não foram constatadas diferenças estatísticas nas médias de momentos de ovulação, após a retirada do implante. Isso pode ter ocorrido, pois o procedimento de autoclavagem altera a quantidade de P4 liberada pelo implante, mantendo teores mais altos do hormônio, ou pelo baixo número de animais participantes.

Isso indica que à medida que o animal recebe menores teores plasmáticos de P4, o folículo dominante cresce mais rapidamente, devido à maior pulsatilidade do LH e ovula em menor intervalo de tempo. Não ocorreu uma interação entre tratamento e condição ovariana neste caso, porém 60% dos animais estavam ciclando. Pode-se supor que esta alta ciclicidade tenha contribuído para minimizar ovulações precoces.

Espera-se que animais com P4 endógena não sejam tão dependentes daquela liberada pelo implante, ovulando então no período esperado. Estes dados vão ao encontro daqueles encontrados por McPhee et al. (1983), onde os intervalos entre a retirada do implante, ovulação e estro não diferiram, conforme a fase do ciclo em que os tratamentos foram iniciados.

A fertilização deve ocorrer em torno de 6-10h após a ovulação, sendo que o período ótimo para a realização da IATF encontra-se entre 24 e 12h antes da ovulação (ROELOFS et al., 2006).

A inseminação de cada lote no presente estudo durou aproximadamente 3h30. A IATF começou ao redor de 54h após a remoção do implante. A aplicação de BE aconteceu 24h após a retirada, portanto os animais foram inseminados aproximadamente 10-15 horas antes da ovulação, momento considerado ótimo, levando-se em consideração a viabilidade de gametas.

Embora a dispersão da ovulação para as reutilizações tenha sido maior em ambos os estudos, um maior número de animais ovula em torno das 60h após a retirada do implante. Estas variações seriam, portanto, capazes de diminuir a taxa de concepção em alguns animais, que foram inseminados fora do limite mínimo dos horários ótimos preconizados para a inseminação (HUNTER, 1994; ROELOFS et al., 2005).

A variação individual de metabolização e produção endógena de P4 parece ter maior importância conforme a quantidade de P4 nos implantes diminui. Para a maioria dos animais, os teores de P4 provenientes do primeiro e segundo usos do implante seriam suficientes para levar à uma melhor sincronização da ovulação.

Isto não ocorre naqueles animais submetidos a teores subluteínicos de P4 no final do protocolo. Nestes, a ovulação está mais sujeita às variações individuais, que ficam mais evidentes em tais teores plasmáticos, ocasionando ovulações não tão concentradas como consequência da maior dependência de fatores como a viabilidade dos gametas e o horário em que o animal é efetivamente inseminado, por exemplo, e principalmente, da sua condição de ciclicidade ou aciclia.

Apesar disto, a variação observada não é capaz de produzir uma queda significativa nas taxas de concepção.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no experimento *in vitro* pode-se concluir que as quantidades de P4 liberadas são maiores no primeiro uso (implante novo), seguidas do segundo uso. Terceiro e quarto usos não diferiram quanto às quantidades liberadas.

Os teores plasmáticos proporcionados pelos quatro usos do Cronipres® até as primeiras 24h de inserção são satisfatórios. As reutilizações levam à teores subluteínicos a partir do 3º dia de tratamento.

Não houve diferença nas taxas de concepção conforme os tratamentos (usos) e tampouco interações entre condição ovariana e escore de condição corporal e tratamento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou avaliar a possibilidade da quarta reutilização do implante Cronipres®, permitindo assim diluir os custos da IATF. O produto atualmente é indicado com duas reutilizações, sendo que no terceiro uso são acrescentados três anéis complementares de P4.

Quando apenas um anel de P4 é adicionado no terceiro uso provoca-se prejuízo nas quantidades liberadas e nos teores plasmáticos alcançados. Não foram encontradas, no entanto, diferenças quanto às taxas de concepção. Os experimentos realizados apresentam crescentes acréscimos de complexidade, sendo que diferenças na P4 são evidenciadas mais facilmente em testes *in vitro*.

Apesar de haver uma queda numérica nas taxas de concepção, estas não apresentaram diferença estatística, contudo, é provável que os animais tratados com o 3º e 4º usos estejam ovulando mais cedo. Isso deixa a concepção mais suscetível a fatores como a viabilidade dos gametas, e, portanto, seria prudente sugerir uma antecipação do momento da inseminação nestes animais.

A adaptação da classe de animais tratados com as reutilizações também pode ser adotada. Novilhas e animais ciclando provavelmente apresentarão melhores taxas de concepção ao final de tratamentos com menores concentrações de P4 exógena.

Conclui-se, finalmente, que a reutilização até o quarto uso é possível. Entretanto, com base nos resultados das quantidades liberadas *in vitro* e teores plasmáticos proporcionados por implantes de 3º e 4º usos, o intervalo retirada do implante-inseminação e classe dos animais tratados, devem merecer atenção especial.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 627-640, 1992.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos Taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14, p. 411-420, 1980.
- AHUJA, C.; MONTIEL, F.; CANSECO, R.; SILVA, E.; MAPES, G. Pregnancy rate following GnRH + PGF2 α treatment of low body condition, anestrous *Bos Taurus* by *Bos indicus* crossbred cows during the summer months in a tropical environment. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 87, p. 203– 213, 2005.
- ALLEN, W. M. The isolation of crystalline progestin. **Science**, v. 82, p. 89-93, 1935.
- ANDERSON, L. H.; DAY, M. L. Development of a progestin-based estrus synchronization program: I. Reproductive response of cows fed melengesterol acetate for 20 days with an injection of progesterone. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1267-1272, 1998.
- BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W. Changes in follicular development, aromatase activity, and follicular steroids in dominant and subordinate follicles at days 5, 8 and 12 of the estrous cycle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 44, p. 71, 1991. Supplement 1.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Ciclo Ovariano, In: BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em Bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 38-52.
- BARNETT, C. R.; GIBSON, G. G.; WOLF, C. R.; FLATT, P. R.; IOANNIDES, C. Induction of cytochrome P450III and P450IV family proteins in streptozocin-induced diabetes. **The Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 765-769. 1990.
- BARUFI, F. B. **Sincronização do ciclo estral e da ovulação em bovinos de corte usando tratamentos com Crestar, CIDR ou CIDR reutilizado, seguidos ou não pela administração de eCG**. 2002. 68 f. Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JUNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2º, 2004. São Paulo: FMZU - USP, 2006, p. 113-132.
- BARUSELLI, P. S.; BÓ, G. A.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004. São Paulo: FMZU - USP, 2004, p. 56-80.

BELL, D. J.; SPITZER, J. C.; BURNS, G. L. Comparative effects of early weaning or once-daily suckling on occurrence of postpartum estrus in primiparous beef cows. **Theriogenology**, v. 50, p. 707-715, 1996.

BERGFELD, E. G. KOJIMA, F. N.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOCK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 257-265, 1995.

BERGFELD, E. G. M.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KINDER, J. E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 546-553, 1996.

BERGFELT, D. R.; SEGO, L. H.; BEG, M. A. GINTHER, O. J. Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. **Theriogenology**, v. 59, p. 1811-1825, 2003.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

BÓ, G. A. Dinâmica folicular ovarica em el bovino. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000, p. 332.

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

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

BÓ, G. A.; CUTAIA, I.; BARUSELLI, P. S. Programas de inseminacion artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004, São Paulo: FMZU - USP, 2004, p. 56-80.

BUNT, C. R.; RATHBONE, M. J.; BURGGRAAF, S.; OGLE, C. R. Development of a QC release assessment method for physically large veterinary product containing a highly water insoluble drug and the effect of formulation variables upon release. In:

PROCEEDINGS INTERNATIONAL SYMPOSIUM CONTROLLED RELEASE SOCIETY, 1997, v. 24, 1997, p. 145-146.

BURGGRAAF, S.; RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; PICKERING, K. L. Effect of silicone shore hardness, inert fillers and progesterone particle size upon the release of progesterone from a controlled release intravaginal drug delivery system. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS, 1997, v. 24, 1997, p. 147-148.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 767-783, 1989.

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

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and Progesterone concentrations during follicular deviation in the post ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 189-196, 2007.

CAVALIERI, J. Induction of ovulation *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle following synchronization of oestrous cycles with emphasis on Australian studies. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004, São Paulo: FMZU - USP, 2004, p. 82-104.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; SANTOS, J. E. P. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 56-70, 2009.

CHAO, C. C.; MOSS, G. E.; MALVEN, P.V. Direct opioid regulation of pituitary release of bovine luteinizing hormone. **Life Science**, v. 39, p. 527-534, 1986.

CICINELLI, E. Intravaginal oestrogen and progestin administration: advantages and disadvantages. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 22, p. 391-405, 2008.

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

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865, 2003.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; WHITTAKER, P. R.; GAVAGA, Q. A.; WILDE, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 25-34, 2004.

COPELIN, J. P.; SMITH, M. F.; KESLER, D. H.; GARVERICK, H. A. Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin F_{2α} on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 199-207, 1989.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CROWE, M. A.; PADMANABHAN, V.; MIHM, M.; BEITINS, I. Z.; ROCHE, J. F. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in Follicle-Stimulating Hormone heterogeneity despite major changes in Steroid and Luteinizing Hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 58, p.1445-1450, 1998.

CUTAIA, L.; AVILES, M.; FERESIN, F.; FRANZONI, A.; PERES, L.; PINCINATO, D.; BÓ, G.A. The effect of progesterone content in a vaginal insert on pregnancy rates in beef and dairy cattle inseminated at fixed time. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.114, 2005, abstract.

DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1-15, 1998.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrus *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 487-494, 2004.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 345-370, 2003.

DUBY, R. T.; BROWNING, T.; CAREY, D.; BLACK, D.L. Progesterone synthesis and histology of postpartum bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 23, p. 620-630, 1985.

DUCHENS, M.; MACIEL, M.; GUSTAFSSON, H.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINES, H.; EDQVIST, L. E. Influence of peri-estrous suprabasal progesterone levels on cycle length, oestrous behaviour and ovulation in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 95-108, 1995.

DUNN, T. G.; INGALLS, J. E.; ZIMMERMAN, D. R.; WILTBANK, J. N. Reproductive performance of 2-year-old Hereford and Angus heifers as influenced by pre- and post-calving energy intake. **Journal of Animal Science**, v. 29(2), p. 719-726, 1969.

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

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

ESTERGREEN, V. L.; LIN, M. T.; MARTIN, E. L.; MOSS, G. E.; BRANEN, A. L.; LUEDECKE, L. O., SHIMODA, W. Distribution of progesterone and its metabolites in

cattle tissues following administration of progesterone -4- $^{14}\text{C}^{1,2,3,4}$. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 642-651, 1977.

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

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

GARCIA-WINDER, M.; IMAKAWA, K.; DAY, M. L.; ZALESKY, D. D.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Effect of suckling and ovariectomy on the control of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 771-778, 1984.

GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; DEEVER, D. R.; SMITH, V. G.; LEWIS, G. S.; INSKEEP, E. K. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1353-1362, 1986.

GARVERICK, H. A.; PARFER, J. R.; LEE, C. N.; COPELIN, J. P.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Relationship of pre- and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 104-111, 1988.

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

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

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

GOMES, G. C.; KEHRLE, A.; MATURANA FILHO, M.; CAETANO, C. F. V.; PIMENTEL, J. R. V.; MIGUEZ, P. H. P.; MADUREIRA, E. H. *In vitro* progesterone release kinetics: a comparative study of different intravaginal devices used in cattle. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE IETS, 37th, 2010, v. 23, 2010, p.111-112.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; SILVEIRA, R. S.; FERREIRA, R. Anestro pós-parto em vacas de corte. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2º, 2006, São Paulo: FMZU - USP, 2006, p. 105-116.

GRAHAM, J. D. and CLARKE, C. L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 502-519, 1997.

GREGORY, R. M., ROCHA, D. C. Protocolos de sincronização e indução de estros em vacas de corte no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004, São Paulo: FMZU - USP, 2004, p. 147-154.

GUIOCHON-MANTEL, A. 1. Structure of the Progesterone Receptor and Mode of Action of Progesterone. In: **Progestins and Antiprogestins in Clinical Practice**, Part I. Physiological Aspects Sitruk-Ware, R. e Mishell Jr. D.R. Ed. Marcel Decker, 2000.

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

HATLER, T. B.; HAYES, S. H.; RAY, D. L.; REAMES, P. S.; SILVIA, W. J. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 360-368, 2008.

HAWKINS, D. E.; NISWENDER, K. D.; OSS, M. G.; MOELLER, C. L.; ODDE, K. G.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 541-545, 1995.

HU, Y. F.; SANDERS, J. D.; KURZ, S. G.; OTTOBRE, J. S.; DAY, M. L.; In vitro prostaglandin production by bovine corpora lutea destined to be normal or short-lived. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 801-807, 1990.

HUNTER, R. H. F. Causes of failure of fertilization in domestic species. In: Zavy, M.T.; Geisert, R.D. (Eds). **Embryonic Mortality in Domestic Species**. Boca Raton: CRC Press, Boca Raton, FL, VS, p. 1-22, 1994.

INSKEEP, E. K.; BRADEN, T. D.; LEWIS, P. E.; GARCIA-WINDER, M.; NISWENDER, G. D. Receptors for Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in largest follicles of post-partum beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 587-591, 1988.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, p. 295-302, 1982.

KASTELIC, J. P. Folliculogenesis in Cattle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004, São Paulo: FMZU - USP, 2004, p. 17-25.

KESNER, J. S.; PADMANABHAN, V. CONVEY, E. M. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 571-578, 1982.

KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; FIKE, K. E.; MARISCAL-AGUAYO, D. V.; SANCHEZ-TORRES, T.; GARCIA-WINDER, M.; CLOPTON, D. T.; ROBERTS, A. J.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 187-211, 2003.

LARSON, L. L. and BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LEMASTER, J. W.; YELICH, J. V.; KEMPFER, J. R.; SCHRICK, F. N. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers treated with an intravaginal

progesterone-releasing insert combination with prostaglandin F2alpha and estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1860-1868, 1999.

LEMLEY, C. O.; KOCH, J. M.; BLEMININGS, K. P.; KRAUSE, K. M.; WILSON, M. E. Concomitant changes in progesterone catabolic enzymes, cytochrome P450 2C and 3A, with plasma insulin concentrations in ewes supplemented with sodium acetate or sodium propionate. **Animal**, v. 2, p.1223-1229. 2008.

LEMLEY, C. O.; KOCH, J. M.; BLEMININGS, K. P.; WILSON, M. E. Alterations in progesterone catabolic enzymes, CYP2C and CYP3A in hepatocytes challenged with insulin and glucagon. **Journal of Animal and Veterinary Advances**; v. 8, p. 39-46. 2010.

LESHIN, L. S.; RUND, L. A.; KRAELING, R. R.; KISER, T. E. The bovine preoptic area and median eminence: sites of opioid inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3733-3746, 1991.

LIU, J. -C.; SUN, Y.; TOJO, K.; CHIEN, Y. W. Membrane permeation kinetics of nortestosterone: effect of methyl groups on thermodynamics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 25, p. 265-274, 1985.

LONG, S. T.; YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice used CIDR. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 80-82, 2009.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2783-2793. 2005.

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

LÜTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S. E.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, Article in press., 2011.

MACMILLAN, K. L.; WASHBURN, S. P.; HENDERSON, H. V.; PETCH, S. F. Effects of varying the progesterone content of CIDR intravaginal devices and multiple CIDR treatments on plasma progesterone concentrations and residual hormone content. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 50, p. 471-472, 1990.

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

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

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 307-320, 1996.

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

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

MADUREIRA, E. H., PIMENTEL, J. R. V. IATF como ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 1-8, 2005.

MADUREIRA, E. H.; FERNANDES, R. H. R.; ROSSA, L. A. F.; PIMENTEL, J. R. V.; BRAGA, F. A.; PARDO, F. J. D. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode ser útil para encurtá-lo? . SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2º, 2006, São Paulo: FMZU - USP, 2006, p. 63-70.

MAIO, J. R. G.; SANDOVAL, G. A. F.; SOUZA, E. D. F.; NOGUEIRA, G. P.; CIPRIANO, R. S.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M. Concentração sérica de LH em vacas Nelore ciclando ou ovariectomizadas submetidas a tratamento com 2mg de Benzoato de Estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 360, 2006.

MALVEN, P. V.; PARFET, J. R.; GREGG, D. W.; ALLRICH, R. D.; MOSS, G. E. Relationship among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone releasing-hormone in neural tissues of beef cows following early weaning. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 723-733, 1986.

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

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

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. O.; BERGFELT, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, 2000.

MCDUGALL, S.; BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; WILLIAMSON, N. B. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Research in Veterinary Science**, v. 58, p. 212-216, 1995.

MCPHEE, S. R.; DOYLE, M. W.; DAVIS, I. F.; CHAMLEY, W. A. Multiple use of progesterone releasing intravaginal devices for synchronization of oestrus and ovulation in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, p. 40-43, 1983.

MEDALHA, A. G.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; PENTEADO, L.; REZENDE, C. R.; NASSER, L. F. T.; CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; SOUZA, M. I. L.;

BARUSELLI, P. S. Efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) na IATF de vacas Nelore (*Bos indicus*). In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2009, Belo Horizonte, 2009, p. 502.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I. Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009.

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

MILLER, W. R.; TURNER, C. W.; FUKUSHIMA, D. K.; SALAMON, I. I. The identification of C₁₉ steroid in bovine feces. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 220, p. 221-225, 1955.

MILLER, W. R.; WILLIAMS, R.; PIPES, G. W.; TURNER, C. W. Conjugation, distribution, and biological half-life (t_{1/2}) of radioactive progesterone in plasma and red cells of bovine blood. **Journal of Dairy Science**, v. 46, p. 1402-1404, 1963. Abstract.

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

MUNRO, R. K. The effects of duration and concentration of plasma progesterone in cows after treatment with 3 types of progesterone pessaries. **Australian veterinary Journal**, v. 66, p. 385, 1987.

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

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Follicular growth in post partum beef suckled cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 523-533, 1990.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckled cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 523-533, 1990.

MYERS, T. R.; MYERS, D. A.; GREGG, D. W.; MOSS, G. E. Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6(3), p. 183-190, 1989.

NETT, T. M.; CERMAK, D.; BRADEN, T.; MANNS, J.; NISWENDER, G. Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. II. Changes during the postpartum period. **Domestic Animal Reproduction**, v. 5(1), p. 81-89, 1988.

NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Update. National Academy Press. Washington, DC. 2000

ODDE, K. G.; WARD, H. S.; KIRACOFÉ, G. H.; MCKEE, R. M.; KITOK, R. J. Short estrous cycles and associated serum progesterone levels in beef cows. **Theriogenology**, v. 14, p. 105-112, 1980.

PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Interrelationships between progesterone, 13,14-dihydro-15-keto PGF-2 α (PGFM) and LH in cyclic and early pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 221-233, 1990.

PAUL, D. R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, article in press, 2010.

PEGORER, M. F.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; PINHEIRO, V. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous ECG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols in pubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 75, p. 17-23, 2011.

PERRY, R. C.; CORAH, L. R.; KIRACOFÉ, G. H.; STEVENSON, J. S.; BEAL, W. E. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 2548-2555, 1991.

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

PIMENTEL, J. R. V. Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: 2006. Dissertação 97p. (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

PIRES, A. V.; ARAUJO, R. C.; MENDES, C. Q. Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de bovinos de corte. In: SANTOS, F. A. P. In: ANAIS DO 5º SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE - PECUÁRIA INTENSIVA NOS TRÓPICOS, 2004, Piracicaba, FEALQ, 2004, p. 355-398.

RAMIREZ, D. V. e MCCANN, S. M. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. **Endocrinology**, v. 72, p. 452-464, 1963.

RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 853-862, 1990.

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

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

RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUN, M.; QUINTELA, A. T.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; GUERRA, R. D. Situação atual e perspectivas do controle

farmacológico do ciclo estral em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl.5, p. 9-17, 2002.

ROBINSON, R. S.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Supra-basal progesterone concentrations during the follicular phase are associated with development of cystic follicles in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 340-346, 2006.

ROCHE, J. F. Effect of short-term progesterone treatment on oestrous response and fertility in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 433-440, 1974.

ROCHE, J. F. Control of estrus in cattle using progesterone coils. **Animal Reproduction Science**, v. 1, p. 145-154, 1978.

ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Effect of exogenous progesterone on time of occurrence of the LH surge in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 580-586, 1981.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 371-378, 1992.

ROELOFS, J. B.; GRAAT, E. A. M.; MULLAART, E.; SOEDE, N. M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173-2181, 2006.

ROSSA, L. A. F.; BERTAN, C. M.; ALMEIDA, A. B.; GASPAR, P. S.; MAZZA, P. H.; BINELLI, M.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. Efeito da eCG ou benzoato de estradiol associado ao norgestomet na taxa de concepção de vacas de corte submetidas à IATF no pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2009.

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

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

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 23-30, 2010.

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

SANTOS, J. E. P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivo da faculdade de veterinária UFRGS**, v. 26, p. 19-89, 1998.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 513-535, 2004.

SANTOS, J. E. P.; SÁ FILHO, M. F. Nutrição e reprodução em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2º, 2006, São Paulo: FMZU - USP, 2006, p. 30-54.

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREZ, G. C.; SÁ FILHO, O. G.; MACIEL, A. B. B. Concentração sérica de Progesterona em novilhas cruzadas Nelore/Angus tratadas com diferentes dispositivos intravaginais de progesterona. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 217, 2004.

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

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 77-84, 1993.

SCHINGOETHE, D. J.; BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Nutrients needs during critical periods of the life cycle. In: CHURCH, D.C. **The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition**. Prentice Hall, 1988, p. 421-447.

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

SHIMOJO, N.T.; ISHIZAKI, S.; IMAOKA, S.; JUNAE, Y.; FUJII, S.; OKUDA, K.. Changes in amounths of cytochrome P450 isoenzymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microssomes of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, p. 621-627. 1993.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G.; CUSTER, E. E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 799-816, 1990.

SMITH, G. D.; SAWYER, H. R.; MIRANDO, M. A.; GRISWOLD, M. D.; SADHU, A.; REEVES, J. J. Steady-state Luteinizing Hormone Receptor messenger Ribonucleic Acid Levels and Endothelial cell composition in bovine normal and short-lived Corpora Lutea. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 902-909, 1996.

STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in long-term anoestrous suckled beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 49-61, 1995.

STAGG, K.; SPICER, L. J.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotrophin and metabolic hormone

changes, and to interval to first ovulation in beef cows feed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 777-783, 1998.

STEVENSON, J. S.; KNOPPEL, E. L.; MINTON, J. E.; SALFEN, B. E.; GARVERICK, H. A. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 690-699, 1994.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, p. 1108-1114, 1993.

TRENKLE, A.; WILLHAM, R. L. The efficiency of beef production can be improved by applying knowledge of nutrition and breeding. **Science**, v. 198, p. 1009-1015, 1977.

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

TROXEL, T. R.; KESLER, D. J. The effect of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretions of anestrous postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 21, p. 699-711, 1984.

TROXEL, T. R.; OPSOMER, M. J.; KESLER, D. J. The effect of days postpartum, indomethacin and oxytocin on prostaglandin metabolite concentrations in postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 22, p. 187-196, 1984.

TURINO, L. N.; MARIANO, R. N.; CABRERA, M. I.; SCÁNDOLO, D. E.; MACIEL, M. G.; GRAU, R. J. A. Pharmacokinetics of progesterone in lactating dairy cows: gaining some insights into the metabolism from kinetic modeling. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 988-999, 2010.

VALENTIM, R. Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados na inseminação artificial em tempo fixo. 2004. Tese. 91p. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VANCLEEF, J. V.; LUCY, M. C.; WILCOX, C. J.; THATCHER, W. W. Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows treated with new or used controlled internal drug release devices. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 91-106, 1992.

WAGNER, W. C.; OXENREIDER, S. L. Endocrine physiology following parturition. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 1-16, 1971.

WALTERS, D. L.; KALTENBACH, C. C.; DUNN, T. G.; SHORT, R. E. Pituitary and Ovarian Function in Postpartum Beef Cows. I. Effect of Suckling on Serum Follicular Fluid Hormones and Follicular Gonadotropin Receptors. **Biology of Reproduction**, v. 26, p. 640-646, 1982.

WALTERS, D. L.; SCHALLENBERGER, E. Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 503, 1984.

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

WEBB, R.; LAMMING, G. E.; HAYNES, N. B.; FOXCROFT, G. R. Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in post-partum dairy-cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 133-143, 1980.

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

WHISHART, D. F. Synchronization of oestrus in heifers using steroid (SC5914, SC9880 and SC21009) treatment for 21 days. **Theriogenology**, v. 8(5), p. 233-247, 1977.

WHISNANT, C. S.; KISER, T. E.; THOMPSON, F. N.; BARB, C. R. Naloxone infusion increases pulsatile luteinizing hormone release in postpartum beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 3(1), p. 49-54, 1986.

WILLIAMS, W. F. Excretion of progesterone and its metabolites in milk, urine, and feces. **Journal of Dairy Science**, v. 45 (12), p.1541-1542, 1962.

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

WILTBANK, J. N.; ROWDEN, W. W.; INGALLS, J. E.; GREGORY, K. M.; KOCH, R. M. Effects of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. **Journal of Animal Science**, v. 21(2), p. 219-225, 1962.

WILTBANK, J. N.; INGALS, J. E.; ZIMMERMAN, D. R. Influence of postpartum energy level on reproductive performance in Hereford cows restricted in energy intake prior to calving. **Journal of Animal Science**, v. 23(4), p. 1049-1053, 1964.

WILTBANK, J. N. Research needs in beef cattle reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 31(4), p. 755-762, 1970.

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

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

WISHART, D. F. Synchronization of oestrus in heifers using steroid (SC5914, SC9880 and SC21009) treatment for 21 days. **Theriogenology**, v. 8, n. 5, p. 233-247, 1977.

WOODY, C. O. and GINTHER, O. J. Effect of exogenous progesterone on corpora lutea in unilaterally hysterectomized heifers. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 1387-1390, 1968.

YAVAS, Y. and WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 1-23, 2000.

YAVAS, Y. and WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, p. 24-55, 2000.

YOU, L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolism enzymes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, p. 233-246, 2004.

ZOLLERS, W. G.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F.; MOFFATT, R. J.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 329-337, 1993.

ZULUAGA, J. F. e WILLIAMS, G. L. High-pressure steam sterilization of previously used CIDR inserts enhances the magnitude of the acute increase in circulating progesterone after insertion in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 30-35, 2008.