



Humberto Luis Del Hoyo Neri

PERFIL DE PROGESTERONA SÉRICA EM FÊMEAS BOVINAS UTILIZANDO
IMPLANTES VAGINAIS EM DIFERENTES SITUAÇÕES FISIOLÓGICAS

ALFENAS – MG
2013

HUMBERTO LUIZ DEL HOYO NERI

PERFIL DE PROGESTERONA SÉRICA EM FÊMEAS BOVINAS UTILIZANDO
IMPLANTES VAGINAIS EM DIFERENTES SITUAÇÕES FISIOLÓGICAS

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Mestrado em Medicina Veterinária para a obtenção do título de *Mestre*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas – MG

2013

Neri, Humberto Luiz Del Hoyo

Perfil de progesterona sérica em fêmeas bovinas utilizando implantes vaginais em diferentes situações fisiológicas/.— Humberto Luiz Del Hoyo Neri.-- 2013.

47 f.

Orientador : Prof. Dr Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária –Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas,2013.

1.Corpo lúteo 2. Dispositivos vaginais 3.Folículos 4. IATF 5. Reprodução I. Título

CDU : 636.05:636.2(043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “PERFIL DE PROGESTERONA SÉRICA DE FÊMEAS BOVINAS EM DIFERENTES SITUAÇÕES FISIOLÓGICAS UTILIZANDO IMPLANTES VAGINAIS”.

Autor: Humberto Luis Del Hoyo Neri

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA – REPRODUÇÃO ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes
Orientador

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão

Prof. Dr. Gustavo Augusto de Andrade

Alfenas, 27 de junho de 2013.

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Coordenador do Mestrado em Medicina
Veterinária - Reprodução Animal

AGRADECIMENTOS

À esposa e filhos, pela compreensão dos momentos ausentes.

Ao médico veterinário Rodrigo Reis Garcia de Figueiredo, pelo esforço e pelo companheirismo dedicados à realização do trabalho.

A toda a equipe da Fazenda Serrinha, pelo incansável trabalho nas tarefas necessárias, pela concessão das instalações e dos animais para este estudo.

À empresa Hertape Calier Saúde Animal, pela colaboração e pelo incentivo à conclusão deste curso de pós-graduação.

RESUMO

A progesterona (P4) é imprescindível para a aplicação da técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Os protocolos hormonais utilizados para a IATF movimentam importante valor financeiro, em que a P4 representa 43 % do custo total. A liberação da P4 pelos dispositivos vaginais ocorre por difusão passiva, ou seja, a droga é liberada obedecendo gradiente de concentração, potencializado pela área de superfície de contato entre o dispositivo e o epitélio vaginal. Dada a importância desse esteroide nos protocolos, vários estudos descrevem a reutilização dos dispositivos como uma alternativa de viabilizar a técnica. No entanto, os resultados são controversos e não há uma descrição sobre o padrão de liberação da P4 de implantes utilizados em vacas em diferentes etapas do ciclo estral. Os objetivos foram: 1) avaliar o perfil de P4, de implantes novos contendo 1g de P4, utilizados por 8 dias, em fêmeas com diferentes condições de atividade ovariana luteal; 2) avaliar e comparar entre si e em relação a um dispositivo novo, a liberação de P4 de implantes previamente usados em fêmeas com diferentes condições de progesterona endógena e 3) correlacionar a liberação de progesterona de implantes de 1º e 2º uso com a dinâmica de desenvolvimento folicular. Para isso, foram realizados dois experimentos. Exp. 1: Grupo 1 (G1a): com corpo lúteo durante todo o tratamento; Grupo 2 (G2a): com corpo lúteo a metade do tratamento e Grupo 3 (G3a): sem corpo lúteo. Os animais dos Grupos G1a e G2a iniciaram o tratamento (D0) com um corpo lúteo funcional, formado oito dias antes da inserção do implante. No G2a, foi aplicada, três dias após a inserção do implante, D3, (0,15 mg de D-cloprostenol) visando luteólise. Os 10 animais do G3a iniciaram o tratamento sem atividade ovariana luteal. Duas amostras de sangue foram coletadas no D0, pela manhã e à tarde, e no D3, no D5 e no D8, à tarde. O nível de P4 foi obtido por radioimunoensaio (RIA). As médias de P4 das amostras foram comparadas pelo teste de tukey. G1a e G2a diferenciaram de G3a no D0 ($5,3 \pm 3,1^a$; $5,3 \pm 1,4^a$ e $0,6 \pm 0,3^b$ ng/mL, respec. ($p < 0,05$)) e no D3 ($5,7 \pm 2,6^a$; $5,4 \pm 1,95^a$ e $3,6 \pm 0,8^b$ ng/mL, respec. ($p < 0,05$)). Em D5, 36 horas após a PGF do G2a, este passou a níveis semelhantes a G3a e ambos se diferenciaram de G1a (G1a= $3,3 \pm 1,6^a$, G2a= $2,4 \pm 0,9^b$ e G3a= $2,1 \pm 0,7^b$ ng/mL ($p < 0,05$)) e no D8 os grupos mantiveram as mesmas características (G1a= $3,1 \pm 1,3^a$, G2a= $1,8 \pm 0,8^b$ e G3a= $1,6 \pm 0,6^b$ ng/mL ($p < 0,05$)). Além disso, a diferença entre o nível sérico de D3 e D0 também foi diferente de G1a e G2a quando comparadas com G3a (G1a= $0,4 \pm 1,8^a$; G2= $0,2 \pm 1,4^a$ e G3= $2,8 \pm 0,9^b$ ng/mL ($p < 0,05$)). Exp. 2: Os mesmos animais foram redistribuídos e, desta vez, divididos em quatro grupos sem a presença de CL. Grupo 1 (G1b):

implantes do G1a, Exp. 01; Grupo 2 (G2b): implantes do G2a, Exp. 01; Grupo 3(G3b): dispositivos de G3a, Exp. 1 e Grupo 4(G4b): implantes novos. Não houve diferença no percentual de animais que apresentaram P4 abaixo de 1 ng/mL durante o tratamento (G1b = 16,7%; G2b = 66%; G3b = 50% e G4b = 0; (p=0,14)) e no número de vezes que isso ocorreu em relação à quantidade de amostras avaliadas (G1b = 12,5 %; G2b = 22,9 %; G3b = 12,5 % e G4b = 0; (p=0,07)), ou seja, não houve padrão na liberação de P4 de implantes reutilizados e somente os implantes novos mantiveram níveis adequados desse hormônio. A média das taxas de crescimento folicular (mm/dia) (G1b = $1,0 \pm 0,5$; G2b = $1,0 \pm 0,3$; G3b = $0,7 \pm 0,5$ e G4b = $0,8 \pm 0,3$) e o diâmetro (mm) do maior folículo em D8 (G1b = $13,0 \pm 3,3$; G2b = $12,0 \pm 2,3$; G3b = $10,5 \pm 2,9$ e G4b = $11,4 \pm 0,6$) também não foram alterada pelo perfil de liberação a partir dos dispositivos. Diante desses resultados, conclui-se que animais com a presença de CL e P4 endógena durante o protocolo de IATF consomem menor quantidade de P4 dos implantes que animais sem CL; implantes de P4 novos mantêm níveis satisfatórios de P4 para a IATF, independentemente da condição fisiológica da fêmea tratada; dispositivos reutilizados oriundos de animais em diferentes condições de ciclicidade não mantêm perfis de progesterona semelhantes àqueles do uso prévio (1º uso); a dinâmica folicular não foi alterada em função da ausência de padrão na liberação de P4 dos implantes reutilizados quando comparados a implantes novos e que Implantes novos, a despeito da maior liberação de progesterona, não interferem no padrão de desenvolvimento folicular em novilhas.

PalavrasChave: Corpo Lúteo; Dispositivos Vaginais; Foliculos; IATF; Reprodução.

ABSTRACT

Progesterone (P4) is an important steroid hormone in FTAI programs. Hormonal protocols used in FTAI programs involve considerable financial values, in which P4 represents 43% of the total cost. The P4 release process from vaginal implants occurs by passive diffusion, i.e., the drug release is driven by concentration gradient and enhanced by the contact area between the implant and vaginal epithelium. Given the importance of P4 in the protocols and the significance of this steroid in the treatment costs, several studies described the reutilization of P4 vaginal implants as an alternative to make this technology feasible. However, the results are controversial and the pattern of P4 releasing from vaginal implants used in cows with different luteal activity (amount of endogenous P4 synthesis) is not yet described. The aim of the present study was to evaluate the P4 profile in cows with different luteal activity treated with a new vaginal implant (1g of P4) for 8 days; evaluate and compare to each other and to a new vaginal implant the P4 releasing from implant previously used in females with different endogenous progesterone conditions; and correlate progesterone releasing from new and used (second use) implants with follicular dynamics. For this purpose, two experiments were performed. Experiment 1: Group 1 (G1a) – with corpus luteum during all treatment period; Group 2 (G2a) – with corpus luteum during half of treatment period; Group 3 (G3a) – without corpus luteum. At the beginning of treatment (D0), G1a and G2a animals had a functional corpus luteum which was formed eight days prior to implant insertion. Three day after implant insertion (D3), 0.15 mg of D-cloprostenol were administered in G2a animals. The G3a animals (n=10) started the treatment without ovarian luteal activity. Blood samples were collected on D0 in the morning and afternoon, D3, D5 and D8. P4 concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA). Average P4 concentrations in each collection were compared by Tukey's test. G1a and G2a was different from G3a on D0 ($5,3\pm 3,1^a$; $5,3\pm 1,4^a$ and $0,6\pm 0,3^b$ ng/mL, respectively ($p<0,05$)) and on D3 ($5,7\pm 2,6^a$; $5,4\pm 1,95^a$ and $3,6\pm 0,8^b$ ng/mL, respectively ($p<0,05$)). On D5, 36 hours after PGF administration, P4 concentration of G2a became similar to G3a and both were different from G1a (G1a= $3,3\pm 1,6^a$, G2a= $2,4\pm 0,9^b$ and G3a= $2,1\pm 0,7^b$ ng/mL ($p<0,05$)). On D8, the groups maintained the same characteristics (G1a= $3,1\pm 1,3^a$, G2a= $1,8\pm 0,8^b$ and G3a= $1,6\pm 0,6^b$ ng/mL ($p<0,05$)). Furthermore, the difference in the P4 serum concentration between D3 and D0 were lower in G1a and G2a than in G3a (G1a= $0,4\pm 1,8^a$; G2= $0,2\pm 1,4^a$ e G3= $2,8\pm 0,9^b$ ng/mL ($p<0,05$)). In experiment 2, the same animals were reallocated into 4 groups without CL. Group 1 (G1b) – implants

from G1a of Exp1; Group 2 (G2b) – implants from G2a of Exp1; Group 3 (G3b) – implants from G3a of Exp1; and Group 4 (G4b) – new implants. There is no difference in the number of animals with P4 lower than 1 ng/mL (G1b = 16.7%, G2b = 66%, G3b = 50% and, G4b = 0; $P=0,14$) and in the number of times that this occurred in relation to the amount of samples evaluated (G1b = 12.5 %, G2b = 22.9 %, G3b = 12.5 % and, G4b = 0; $P=0,07$), i.e., there were no P4 releasing pattern from used implants and only new implants properly maintained the concentration of this hormone. The average follicular growth rate (G1b = $1,0\pm0,5$; G2b = $1,0\pm0,3$; G3b = $0,7\pm0,5$ e G4b = $0,8\pm0,3$) mm/day) and the diameter of the largest follicle on D8 (G1b = $13,0\pm3,3$; G2b = $12,0\pm2,3$; G3b = $10,5\pm2,9$ e G4b = $11,4\pm0,6$ mm) were also not affected by the releasing pattern of the implants. In conclusion, animals with CL and endogenous P4 during FTAI protocols consumed less P4 from the implants when compare to animals without CL; new P4 vaginal implants maintained adequate levels of P4 for FTAI, regardless the physiological condition of the treated animal; implants previously used by animals with different ovarian activity did not maintain the P4 profile similar to that observed with new implants; follicular dynamics was not changed by the lack of P4 releasing pattern from the used implants when compared to new implants; despite the greater progesterone release, did not affect follicular development pattern in heifers.

Keywords: corpus luteum, vaginal implants, follicles, FTAI, reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Protocolo de Pré-sincronização e de tratamento do G1a, Experimento 01.....	26
Figura 02. Protocolo de Pré-sincronização e de tratamento do G2a, Experimento 01.....	27
Figura 03. Protocolo de Pré-sincronização e de tratamento do G3a, Experimento 01.....	27
Figura 04. Protocolo de coleta de sangue para os animais dos três grupos de tratamento.....	28
Figura 05. Protocolo de Pré-sincronização e de tratamento dos animais do Experimento 01.....	29
Figura 06. Esquemas de coleta de sangue e avaliação da emergência folicular dos três grupos de tratamento do Experimento 2.....	30
Figura 07. Perfil de liberação de Progesterona (P4) em novilhas com diferentes situações de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo.....	33
Figura 08. Diferença entre os dias 03 (D3) e zero (D0) quanto ao nível plasmático de progesterona (P4) de novilhas com diferentes condições de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo.....	34
Figura 09. Curva de liberação média de progesterona (P4) a partir de implantes previamente utilizados em diferentes situações (animais com e sem CL), em novilhas sem a presença de corpo lúteo.....	35

Figura 10. Curva de liberação média de progesterona (P4) a partir de implantes previamente utilizados em diferentes situações (animais com e sem CL), em novilhas sem a presença de corpo lúteo.....37

Figura 11. Avaliação individual da curva de crescimento folicular de novilhas sem corpo lúteo, tratadas com implantes usados previamente em animais em diferentes condições de ciclicidade.(com e sem CL).....40

Figura 12. Diâmetro médio do maior folículo no final do protocolo de novilhas sem corpo lúteo, tratadas com implantes previamente utilizados em diferentes condições de ciclicidade (com e sem CL).....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Perfil de liberação de progesterona (P4) em novilhas com diferentes condições de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo.....	32
Tabela 02. Porcentagem de animais com P4 menor que 1ng/ml de sangue em pelo menos uma das amostras coletadas.....	36
Tabela 03. Número e porcentagem de dias com P4 menor que 1ng/ml em relação ao número total de amostras avaliadas.....	36
Tabela 04. Concentrações Séricas (ng/mL) de Progesterona (P4) em novilhas tratadas com implantes previamente utilizados em animais com diferentes condições de ciclicidade (com e sem CL).....	38
Tabela 05. Dinâmica folicular (mm) de novilhas sem corpo lúteo tratadas com implantes utilizados previamente em diferentes condições de ciclicidade (com e sem CL).....	40

SUMÁRIO

RESUMO	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Inseminação artificial em Tempo Fixo no Brasil	15
2.2 Princípios da IATF.....	15
2.3 Papel da progesterona nos protocolos	17
2.4 Mecanismos de liberação de progesterona.....	19
2.5 Reutilização dos dispositivos	19
3 HIPÓTESES	22
4 OBJETIVOS	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Animais e local de realização.....	24
5.3.4. Avaliações ultrasonográficas.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A crescente necessidade de aprimoramento técnico da atividade pecuária de corte ou de leite para melhorar a eficiência e a rentabilidade das propriedades é motivo de constante estudo e desenvolvimento de tecnologias de manejo, de nutrição e de melhoramento genético. Entre as questões de maior relevância, está a eficiência reprodutiva, haja visto que o bom desempenho dessa atividade é determinante para o sucesso financeiro das empresas rurais nesse segmento.

Inserida nesse contexto, está a técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que otimiza a utilização de uma biotécnica de grande importância para melhoramento genético, a inseminação artificial. A IATF permite a indução sincronizada da ovulação das matrizes em momentos pré-determinados e proporciona, entre outras vantagens, a antecipação da data de concepção com consequente diminuição do intervalo de partos, a concentração dos serviços de monta e dos nascimentos e o ganho genético obtido com o maior número de crias oriundas de touros melhoradores. Além de ferramenta para o melhoramento genético, a IATF pode proporcionar ganhos de desempenho reprodutivo, principalmente em zebuínos.

Segundo a Asbia (Associação Brasileira de Inseminação Artificial), nos anuários de 2012, foram comercializadas no Brasil nesse mesmo ano, um total de 12 milhões e trezentas mil doses de sêmen, sendo 7 milhões e quatrocentas mil para rebanhos de corte e 04 milhões e novecentas para rebanhos de leite. Entre esse volume, conforme a instituição, aproximadamente 60 % das matrizes de gado de corte inseminadas utilizaram a IATF como ferramenta de concepção e algo em torno de 10 % para as matrizes leiteiras. Isso confere movimentação financeira que atinge o montante dos 95 milhões de reais somente com os tratamentos hormonais necessários para a aplicação da técnica.

Para a aplicação dessa técnica, as matrizes recebem a administração de hormônios exógenos que controlam a emergência sincronizada de uma nova onda de desenvolvimento folicular, simulando as ocorrências fisiológicas do ciclo estral desses animais. Entre esses hormônios, a progesterona (P4), além de ser essencial para a eficácia do tratamento, é de grande importância por representar em torno de 45 % do custo total do processo. Normalmente, são utilizados dispositivos intravaginais impregnados com esse hormônio que o mantém em níveis subluteais durante o período necessário. Nesse contexto, vários estudos vêm sendo realizados para viabilizar e estender a reutilização desse produto em virtude da progesterona residual após sua reutilização, mantendo a eficiência dos tratamentos com redução de custos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inseminação artificial em Tempo Fixo no Brasil

A atual situação do mercado mundial de produtos de origem animal, com crescente aumento da exigência dos consumidores internacionais, e o cenário econômico brasileiro exigem alta produtividade e qualidade por parte dos produtores de carne e de leite no Brasil. Devido ao fato de a reprodução animal ser uma das principais variáveis que determinam a viabilidade dessas atividades, sua eficiência deve ser constante e detalhadamente gerenciada para garantir o sucesso financeiro da propriedade rural (BARUSELLI et. al. 2004). Segundo Thomas (1992), as vacas deveriam conceber entre 80 e 85 dias pós-parto, devido ao período de gestação de aproximadamente 280 dias, produzindo assim um bezerro/vaca/ano. Por outro lado, as vacas zebuínas apresentam um período de gestação maior que as taurinas - 10 dias em média, devendo reconceber entre 70 e 75 dias após o parto (MADUREIRA et. al., 2004).

Demanda por melhorias quantitativas e qualitativas foi o principal motivador para o maior investimento em ganho genético dos rebanhos, sendo que para isso a Inseminação Artificial foi a ferramenta de tecnologia inicialmente utilizada. Esta apresentou crescimento em torno de 25% (Asbia, 2012 - Associação Brasileira de Inseminação Artificial) ao ano, nos últimos cinco anos, no número de vacas inseminadas. Apesar dos benefícios dessa tecnologia, Bó et. al. (2004) descreveram que sua aplicação depende de observação de cio das matrizes, independentemente do clima, do dia da semana, da época do ano e das tarefas a serem cumpridas pela equipe das fazendas, em alguns casos tornando sua implantação completamente inviável. Como alternativa para contornar essa limitante, nos últimos cinco anos, houve um crescimento médio de 25 % ao ano da utilização da técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) entre as vacas inseminadas artificialmente no Brasil, sendo comercializado algo em torno de 6 milhões de tratamentos hormonais. (ASBIA, 2012).

2.2 Princípios da IATF

A IATF consiste na utilização de diversas combinações hormonais chamadas de protocolos que visam induzir, de forma controlada, alguns eventos fisiológicos relacionados ao ciclo estral. Com isso, espera-se ao final do protocolo induzir da ovulação de grande parte das vacas em um momento pré-determinado, eliminando a necessidade de detecção de estro, deixando a restrição quanto ao uso da

inseminação artificial somente pelo custo da implantação, pela mão de obra da propriedade e pela aplicabilidade em condições de campo (Lucy et. al., 2004).

Esses protocolos de IATF atualmente possuem muitas variações, porém, para que tenham condições de obterem sucesso, necessitam que, além de serem aplicados em animais com ovários que possuam atividade folicular, respeitem os seguintes princípios, relacionados à condições fisiológicas:

Sincronização da onda de desenvolvimento folicular: Trata-se de etapa inicial e fundamental. Com ela, pretende-se que todas as fêmeas colocadas em um protocolo iniciem nova onda de desenvolvimento folicular simultaneamente. Isso, normalmente, é conseguido pela atresia da população folicular existente, usando com agente terapêutico ésteres de estradiol (Benzoato ou Cipionato) (MARTINEZ et al. 2000). Ao se utilizar os mais comuns análogos do estradiol, o efeito mais provável é a atresia folicular generalizada. Essas substâncias, nas doses utilizadas, provocam o bloqueio temporário na produção e nos níveis circulantes de FSH. A queda brusca dessa gonadotrofina leva à atresia de folículos de diferentes tamanhos. Em algumas situações pouco frequentes, especificamente quando o animal for tratado com esses análogos e estiver numa fase em que a progesterona está baixa e exista um folículo pré-ovulatório, ou seja, de grande diâmetro, pode ocorrer ovulação e não atresia (FERNANDES et al., 1997).

Como geralmente provocam atresia, os análogos do estradiol, ao início do tratamento, não padronizam as concentrações de progesterona circulante entre os animais tratados. Ao utilizar essas substâncias na 1ª etapa do protocolo, ou seja, como sincronizadores de onda de desenvolvimento folicular, é importante associar o tratamento aos implantes de progesterona, para que o desenvolvimento folicular seja padronizado nos diferentes animais.

Manutenção de níveis elevados de progesterona: Trata-se da etapa de mais longa duração e que inicia-se juntamente com a sincronização do desenvolvimento folicular. De nada adiantaria sincronizar o início da nova onda nos animais colocados num protocolo de IATF se a partir do início do desenvolvimento da onda subsequente, não houvesse padronização da velocidade deste crescimento. A necessidade de manutenção de concentrações elevadas de progesterona se baseia no fato que os folículos se desenvolvem em velocidades distintas quando as concentrações deste esteroide variam (VIANNA, 2008). A manutenção de concentrações elevadas de progesterona é o que padroniza o crescimento folicular após a onda de desenvolvimento sincronizada. Dessa forma, espera-se que o ritmo de crescimento seja o mais semelhante possível entre as fêmeas tratadas e que, ao final, o diâmetro do folículo préovulatório seja o mais semelhante possível (COSTA et al., 1999).

Redução na concentração de progesterona: Além da retirada dos dispositivos intravaginais, a aplicação de luteolíticos (PGF) visa reduzir as concentrações circulantes de progesterona, para permitir o final do crescimento folicular até o estágio compatível com a ovulação. No caso de se estar utilizando implante, o mesmo deve ser removido. É imprescindível que a progesterona sofra uma queda intensa e brusca, pois isto é necessário para a ocorrência de uma série de eventos fisiológicos como final do desenvolvimento folicular, da ovulação, do transporte e da capacitação espermática, entre outros. Caso não haja essa queda de progesterona, todos esses mecanismos estariam comprometidos, afetando sem dúvida os resultados finais do protocolo (ALMEIDA et. al. 2006).

Indução da ovulação: A etapa final seria induzir a ovulação do folículo já desenvolvido em um período pré-determinado em todos os animais, para que, se possível, determine-se com a maior exatidão o momento da ovulação e a consequente inseminação. Isso geralmente é conseguido com a aplicação de análogos de GnRH ou do estradiol. A eficiência dessa etapa depende diretamente das duas anteriores. É necessário que haja um folículo com desenvolvimento suficiente para ovular e que as concentrações de progesterona estejam baixas. Caso essas situações não sejam totalmente atendidas, não se alcançaria o efeito desejado. Segundo Dogi (2005), com a queda da progesterona, ocorre aumento dos pulsos de LH e crescimento do folículo dominante que ovulará entre 48 e 72 horas após a retirada do implante.

2.3 Papel da progesterona nos protocolos

Os dispositivos impregnados com P4 representam em torno de 45 % do custo total dos tratamentos hormonais. Devido a essa importância financeira e à dependência do uso desse hormônio nos protocolos, alguns autores, como Motlomelo (2002) e Almeida et. al. (2006), descrevem a reutilização dos implantes vaginais como uma alternativa interessante para aumentar a viabilidade da técnica, no entanto muitos trabalhos foram realizados de forma empírica. A segurança dessa reutilização e os resultados possuem um alto grau de variabilidade, faltando padronização e triagem nos delineamentos experimentais.

Segundo Shaham-Albalancy et al. (2000), o crescimento e o metabolismo folicular e a sucessão das ondas de desenvolvimento são muito influenciados pelas concentrações circulantes de P4. Esses autores mostram que, em concentrações normais (luteais) de P4, o metabolismo dos folículos, mensurado pela concentração de 17β -estradiol no líquido folicular, indicando atividade das células da granulosa, é

diferente de quando as concentrações estão abaixo das consideradas normais. Quando as concentrações de P4 são pequenas, ao final da onda, ou seja, na fase final do desenvolvimento folicular, pode não haver a atresia fisiológica do folículo dominante. Assim, essa estrutura se mantém ativa e se desenvolve até um diâmetro superior ao normal, impedindo o início de uma nova onda, condição caracterizada como persistência do folículo dominante. Embora esse folículo persistente possa ovular e formar corpo lúteo quando a P4 baixar, o oócito no seu interior tem menos condições de ser fecundado, reduzindo a fertilidade da fêmea submetida a essas condições endocrinológica de P4 sub luteal.

Vacas com níveis reduzidos de P4 durante a fase luteal do ciclo estral que antecede a inseminação artificial apresentam índices de fertilidade menores que vacas com elevadas concentrações desse hormônio na mesma fase (FOLMAN et al., 1973; 1990; FONSECA et al., 1983; HOLNESS et al., 1981). Nos estudos desses autores, a P4 foi secretada pela presença de um corpo lúteo, resultando em uma curva de concentração plasmática de progesterona, que, embora baixa, foi crescente durante a primeira parte do ciclo estral. Em outros estudos, quando o corpo lúteo foi eliminado por intermédio da aplicação de PGF2 α e quando dispositivos de P4 foram inseridos na vagina, promovendo concentrações baixas e lineares ou com curva baixa e decrescente, foram obtidas taxas consideravelmente menores de viabilidade oocitária (REVAH and BUTLER, 1996), sobrevivência embrionária (AHMAD et al., 1995) e de gestação (COOPERATIVE PROJECT, 1996; MIHM et al., 1994; SAVIO et al., 1993; SMITH and STEVENSON, 1995). Nesses e em outros estudos (ADAMS et al., 1992; KINDER et al., 1996; SIROIS and FORTUNE, 1990), o folículo dominante manteve-se por um longo período, tornando-se persistente e suprimindo o crescimento de outros folículos. O decréscimo na fertilidade foi atribuído à dominância prolongada desse folículo, possivelmente pela maturação prematura do oócito (mihm et al., 1999; REVAH and BUTLER, 1996).

Xu et. al. (1997) observaram que baixos níveis de P4 durante a emergência folicular resultam em menores taxas de gestação após a inseminação artificial das matrizes, porém não quantificaram a concentração sérica desse esteroide. Por outro lado, Inskeep (2004) descreveu que a progesterona abaixo de 1 ng/mL pode causar a maturação precoce dos folículos e dos oócitos, por aumento da frequência dos pulsos de LH, ocasionando redução da fertilidade. Esse mesmo autor ainda relata que a concentração de P4 é responsável por 37% na variação da frequência dos pulsos de LH e por 38% da variação na concentração de estradiol (E2), enquanto o pulso de LH é responsável por 50% da variação da concentração de E2. Rivera et. al. (2011) corroboram esses dados ao observarem que vacas superovuladas na segunda onda

de desenvolvimento folicular, em que a P4 apresenta níveis séricos mais elevados, obtiveram embriões com qualidade superior quando comparadas àquelas superestimuladas na primeira onda (entre 5 e nove dias no último cio), com menores concentrações desse esteroide. Savio e colaboradores (1993), descreveram que o nível mínimo necessário para a P4 circulante inibir os pulsos de LH é de 1 ng/mL.

2.4 Mecanismos de liberação de progesterona

Na difusão, em um transporte passivo, as substâncias migram entre dois compartimentos por difusão, seguindo um gradiente de concentração. A velocidade de passagem entre os compartimentos ocorre em virtude de sua solubilidade na camada bilipídica e da diferença de concentração entre ambos. Essa transferência é diretamente proporcional à magnitude do gradiente de concentração através da membrana, pelo coeficiente de lipossolubilidade da droga e pela área de superfície da membrana exposta à droga. Ao atingir um estado estacionário, a concentração da droga não vinculada ao veículo é a mesma em ambos os lados da membrana, se a droga não for eletrolítica (BRUNTON & PARKER, 2008)

A difusão passiva é um importante mecanismo na farmacocinética, principalmente de agentes lipofílicos, dentro dos quais se enquadra a progesterona, derivada do colesterol. A maioria dos sistemas que utilizam mecanismo de liberação controlada a partir de dispositivos tem como base esse princípio da difusão que se baseia na passagem de uma substância permeável a favor de gradiente de concentração. Normalmente, esses mecanismos de aplicação de substâncias via implantes são requeridos quando se deseja liberação lenta e manutenção de níveis plasmáticos do princípio ativo por mais tempo (LAVY et al. 2006). Os implantes intravaginais de progesterona são a forma mais interessante de aplicação dessa substância quando se deseja manutenção de níveis plasmáticos por longos períodos. O epitélio vaginal é altamente permeável aos esteroides e a seus análogos, permitindo que drogas dessa classe alcancem níveis séricos elevados, poucas horas após a inserção e que ocorra queda acentuada das concentrações logo após a retirada dos dispositivos (ROTHEN-WEINHOLD et al. 2000).

2.5 Reutilização dos dispositivos

Solorzano et al. (2004) relataram que 90 e 93% das vacas sincronizadas com implante de 1,9 g de P4 novo e reutilizado manifestaram sinais de estro após a

retirada do implante, quando associado à aplicação de 2mg de benzoato de estradiol. Isso, porém não indica que os implantes tenham sido efetivos, visto que a manifestação estral, por si só, no caso em questão, poderia estar relacionada não somente à queda na progesterona, mas à aplicação do análogo do estradiol. Outra fonte de variação nesse e outros estudos é não considerar a concentração de P4 endógena.

Bó e Cutaia (1998) compararam a porcentagem de gestação em vacas tratadas com implante de 1g de progesterona novos e que haviam sido previamente utilizados, e relataram 49,5% de gestação com os dispositivos novos e 59,7%, após segundo uso, e concluíram que é possível reutilizar esses dispositivos por uma segunda vez em tratamentos de sincronização de estros para IATF em bovinos. Por outro lado, Rocha e colaboradores (2007) obtiveram taxas de gestação decrescentes com implantes novos, e utilizados pela segunda e pela terceira vez de 58,06 %, 56,52 % e 52 %, respectivamente. Pela grande quantidade de variáveis que estão relacionadas à taxa de gestação em vacas após protocolos de IATF, é muito difícil afirmar que o número de vezes em que o implante foi utilizado possa ser indicado como fonte ou não de variação, justamente pela dificuldade ou pela quase impossibilidade de se isolarem os efeitos dessa variável.

Macmillan e Peterson (1993) relataram que a concentração de progesterona em vacas ovariectomizadas, tratadas com um implante intravaginal de progesterona, nos dias 14 e 15, foi de 1,9 e 2,3 ng/mL, sugerindo, assim, que o dispositivo poderia ser utilizado por até dois protocolos de sincronização de sete dias. Não se deve considerar que uma única utilização de 14 dias de forma ininterrupta num mesmo animal proporcione liberação de progesterona semelhante a duas utilizações de sete dias em animais distintos. Hermann e Wallace (2007) relataram que a reutilização do implante com 1,9 g em vacas da raça Holandesa não atendeu à necessidade de manutenção da concentração de progesterona sérica acima de níveis para bloquear hipotálamo, e por isso não é efetivo para sincronização do estro nesses animais.

A reutilização desses dispositivos de P4 impõe a necessidade de limpeza, de identificação e de armazenagem adequadas dessas peças para minimizar a ocorrência de vulvovaginites e a transmissão de doenças infectocontagiosas. Essa manipulação poderia variar ainda mais a quantidade de P4 remanescente no implante, haja vista que a lavagem das peças com sabão, por exemplo, poderia extrair um pouco mais do hormônio que é um derivado do colesterol (SENGER, 2002).

Empiricamente, por trabalhos realizados com dosagem de P4 utilizando implantes de 1º, 2º ou 3º uso, tem-se recomendado a possibilidade de mais de uma utilização. Não foi localizado, porém, na literatura, um trabalho que relacione a

liberação de P4 dos dispositivos a animais que possuem distintas condições de concentrações de P4 durante o protocolo, o que é uma realidade.

Devido à grande quantidade de vacas tratadas de uma só vez, principalmente em rebanhos de corte, não existe uma separação entre vacas ciclando ou acíclicas. Isso faz com que os animais sejam todos tratados como se estivessem na mesma situação estral desde o primeiro uso dos implantes, não havendo uma descrição clara sobre a magnitude de liberação da P4 presente nos dispositivos. Esse fato sugere que as segundas e terceiras utilizações de implantes sejam feitas sem padronização da P4 remanescente, podendo alterar a sincronia da onda e, em alguns casos, não suprimir os pulsos de LH, além de provocar outros efeitos já discutidos.

3 HIPÓTESES

- A liberação de P4 a partir de implantes vaginais novos é maior sem progesterona endógena;
- A reutilização de implantes leva a perfis de liberação de P4 distintos daqueles conseguidos no primeiro uso;
- Maiores concentrações de P4, originados com uso de implantes novos, interferem no perfil de desenvolvimento folicular.

4 OBJETIVOS

- Determinar o perfil de liberação de progesterona de dispositivos vaginais novos, em animais com diferentes situações fisiológicas;
- Comparar entre si e em relação a um dispositivo novo, a liberação de P4 de implantes previamente usados em fêmeas com diferentes condições de progesterona endógena;
- Correlacionar a liberação de progesterona de implantes de 1^o e de 2^o uso com a dinâmica de desenvolvimento folicular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e local de realização.

Os estudos foram realizados na Fazenda Serrinha, localizada no município de Betim, Estado de Minas Gerais, com latitude de 19° 58' 04" S e longitude 44° 11' 54" W, altitude de 860 m, clima subtropical e classificação climática Cwa, segundo Köppen-Geiger. O curral de manejo utilizado foi construído em madeira, com piso de concreto e estrutura antiderrapante, com água à disposição dos animais para o período de espera, localizado próximo ao local de permanência dos animais. Para o procedimento de manejo, foi utilizado um tronco de contenção individual, com imobilização no pescoço, região torácica e inguinal dos animais.

Foram utilizadas 30 novilhas com cruzamento racial indefinido, entre 24 e 30 meses de idade, criadas sob o regime extensivo, mantidas em pastagem de *brachiaria decumbens*, com fornecimento *ad libitum* de água e sal mineral de baixo consumo, ausente de grãos em sua composição e específico para fêmeas em reprodução. O estudo das hipóteses foi conduzido em dois experimentos, sendo utilizados os mesmos animais para ambos, porém com randomização entre as fêmeas de maneira que não se repetissem os grupos nos dois experimentos.

Dez dias antes do início dos estudos (D-10), os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal (Mindray-2200 - DPS - Equipamentos médicos, com probe linear de 7.5 MHz) para verificar a atividade reprodutiva. Somente animais contendo corpo lúteo na avaliação, ou seja, cíclicos, foram incluídos nos protocolos de pré-sincronização.

5.2 Experimento 01 - Perfil de liberação de P4 de acordo com a atividade luteal.

5.2.1 Delineamento e tratamentos

Foram formados três grupos de tratamento, cada um contendo 10 animais e com duração de 08 dias. Os animais foram distribuídos entre os grupos aleatoriamente.

Para todos os grupos, os implantes foram colocados com o aplicador recomendado pelo fabricante e as injeções intramusculares de estrógenos e da prostaglandina foram feitas com uso de seringas descartáveis de 5 mL e agulhas de injeção 40 x 12.

Grupo 01 (G1a) - Vacas com CL durante todo o período de tratamento.

Para conseguir essa condição, os animais tiveram o crescimento folicular e a ovulação pré-sincronizados (conforme figura 1). Para induzir a ovulação e um corpo lúteo e sete dias após a ovulação induzida, as fêmeas receberam um implante vaginal novo contendo 1g de P4, juntamente com uma injeção intramuscular de Benzoato de Estradiol na dose de 2 mg pela manhã (D0) e permaneceram com o implante pelo período de 08 dias. Para a pre-sincronização, foi usado um implante de norgestomed por se tratar de um análogo da progesterona não detectado pelo método de análise utilizado e de aplicação auricular, não interferindo no ambiente vaginal.

Experimento 01 – GRUPO 01: Vacas c/ CL

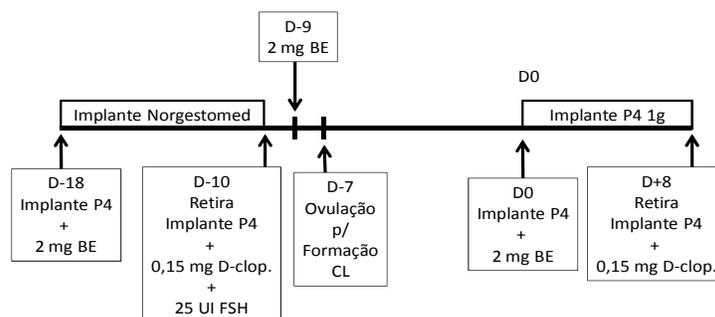


Figura 1: Protocolo de pré-sincronização e de tratamento dos animais do grupo 01

Grupo 02 (G2a) - Vacas com CL metade do período de tratamento.

Esse grupo foi submetido ao mesmo tratamento do G1a para formar CL antes do tratamento. Adicionalmente, recebeu aplicação intramuscular de 0,15 mg de D-cloprostenol no terceiro dia após a colocação do implante, no período da tarde (D 3,5), visando à lise do corpo lúteo previamente formado e à redução de P4 endógena.

Experimento 01 – GRUPO 02: Vacas c/ CL 1/2

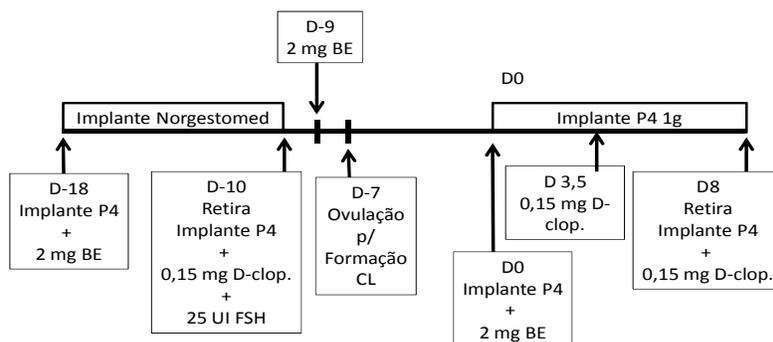


Figura 02: Protocolo de pré-sincronização e de tratamento dos animais do grupo 02

Grupo 03 (G3a) - Vacas sem CL durante todo o tratamento

As novilhas deste grupo iniciaram o tratamento sem P4 endógena. Para isso (Figura 03), receberam um implante auricular com Norgestomed juntamente com uma dose de 2 mg de Valerato de Estradiol no D-9, uma injeção intramuscular de 0,15 mg de D-cloprostenol no D-4, D-2 e no D0, juntamente com a retirada do implante auricular e com a colocação do implante intravaginal de 1 g novo conforme G1a, visando analisar o perfil de liberação da P4 a partir de dispositivos novos, em animais sem progesterona endógena.

Experimento 01 – GRUPO 03: Vacas s/ CL

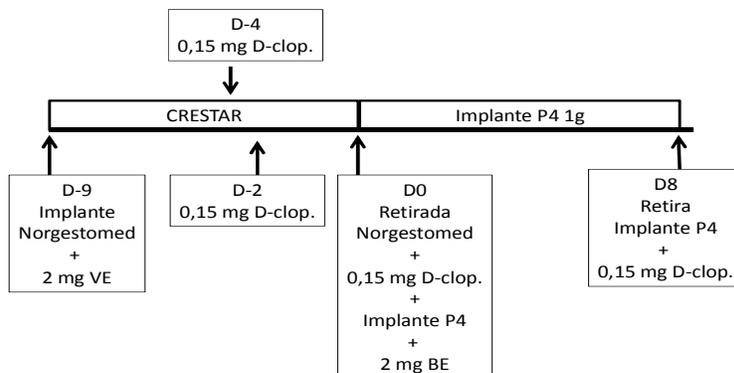


Figura 03: Protocolo de pré-sincronização e de tratamento dos animais do grupo 03

5.2.2 Coletas de Sangue e preparação das amostras

A curva de liberação de P4 foi avaliada por radioimunoensaio, conforme descrito por Fernandes (2000). Conforme demonstrado na Figura 04, as amostras de sangue foram coletadas em todos os grupos no D0, momento da colocação do implante; no D3, antes da aplicação de PGF2alfa do Grupo 02; no D5, após a aplicação da PGF2alfa do Grupo 02 e no D8, momento da retirada do implante, por punção da veia ou artéria coccígea, com agulhas 25 x 08 e armazenados em tubos vacuolizados. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4° C até o momento da centrifugação. Em um intervalo menor que 6 horas após a coleta, todas as amostras foram centrifugadas a 600 G por 10 minutos; em seguida, o soro sanguíneo foi recuperado e estocado a -20°C em frascos eppendorf, devidamente identificados com o número do animal e a data da coleta.

Experimento 01 – Coleta de Amostras para Análise de P4 Todos os grupos

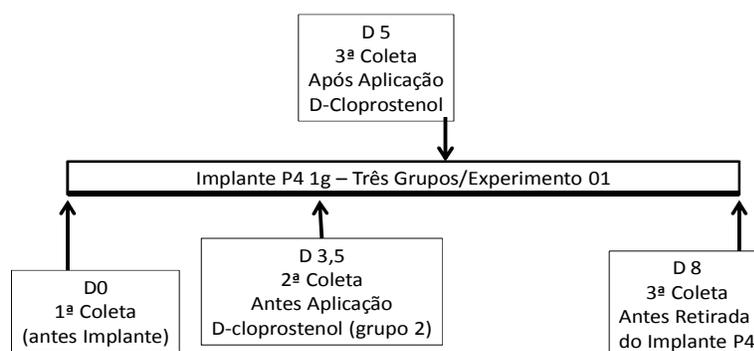


Figura 04: Protocolo de coleta de sangue para os animais dos três grupos de tratamento do experimento 01.

5.2.3 Dosagem de Progesterona

As dosagens hormonais foram executadas por radioimunoensaio. Utilizou-se o *kit* comercial (Siemens Coat-a-count®) conforme metodologia descrita por Fernandes (2000). As análises foram realizadas no Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Unesp-Botucatu.

5.3. Experimento 02 - Perfil de liberação de P4 de implantes novos e previamente utilizados.

5.3.1. Delineamento e tratamentos

As fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de preparação utilizado no Grupo G3a do experimento 1, porém com o uso do Valerato de Estradiol devido a seu efeito luteolítico, para que os 21 animais utilizados neste experimento estivessem todos sem a presença de corpo lúteo. Assim, foram organizados outros 04 grupos de tratamento, sendo que os grupos 1 (G1b), 2 (G2b) e 3 (G3b) com seis animais e o grupo 4 (G4b), com três animais; além disso, as matrizes do estudo foram redistribuídas entre os grupos, de maneira que não recebessem o mesmo implante do Experimento 01. O Grupo G1b recebeu implantes provenientes dos animais do G1a do experimento 01; o G2b, os implantes do G2a do experimento 01; G3b recebeu os implantes provenientes do G3a do experimento 01 e o G4b recebeu implantes novos. Todos os grupos receberam juntamente com o implante uma dose intramuscular de 2 mg de Benzoato de Estradiol.

A lavagem e o armazenamento dos implantes foram feitos com água corrente e auxílio manual para remoção de muco e de outras estruturas. Em seguida, as peças foram imersas em solução de amônia quaternária a 0,5 % para desinfecção e colocados para secar espontaneamente à sombra. Logo após, foram embalados em sacos plásticos e armazenados sob refrigeração até a sua reutilização.

Além disso, nessa fase foi acompanhada por meio de ultrassonografia via transretal a emergência da onda folicular desses animais para verificar a sincronidade relacionada com a curva de P4.

TRATAMENTOS

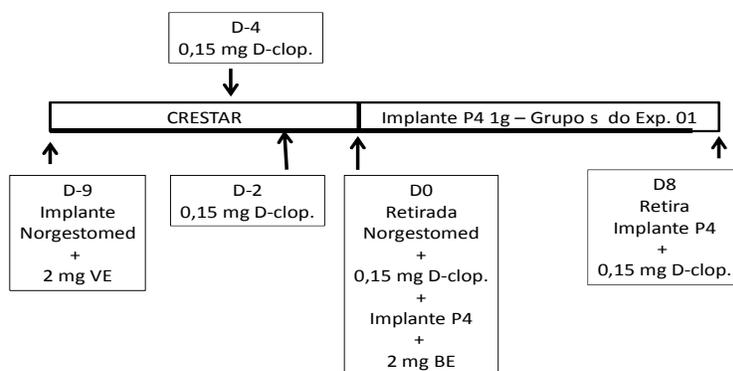


Figura 05: Protocolo de pré-sincronização e de tratamento dos animais do experimento 2.

5.3.2. Colheita e preparação das amostras

Conforme descrito na Figura 06, as coletas de sangue para avaliação do perfil da curva de liberação de P4 foram realizadas no D0, antes da colocação do implante, ainda no D0, 12 horas após a colocação do implante; no D1, 24 horas após a segunda coleta e, a cada 24 horas, até o final do protocolo, totalizando 10 amostras de cada animal. Assim como no experimento 01, a curva de liberação de P4 foi avaliada por radioimunoensaio, conforme descrito por Fernandes (2000) e as amostras de sangue foram coletadas por punção da veia ou da artéria coccígea, com agulhas 25 x 08 e armazenados em tubos vacuolizados. As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até o momento da centrifugação. Em um intervalo menor que 6 horas após a coleta, todas as amostras foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos, em seguida, o soro sanguíneo foi recuperado e estocado a -20°C em frascos eppendorf, devidamente identificados com o número do animal e com a data da coleta.

Experimento 02 – Amostras para Análise de P4 e Monitoramento da Dinâmica Folicular – Todos os grupos

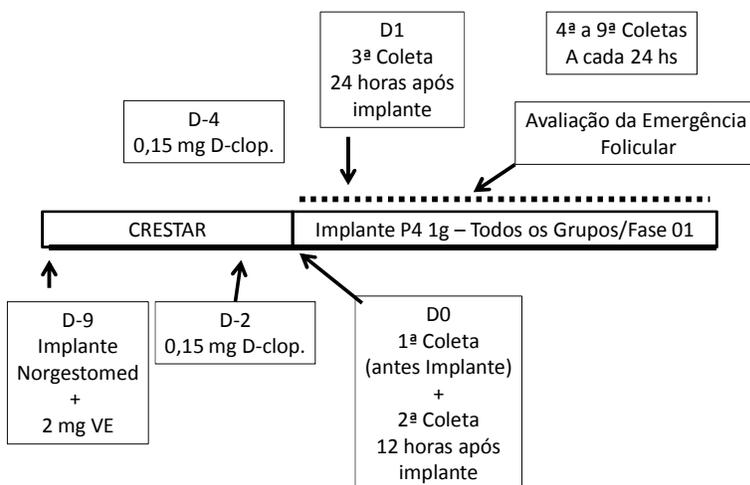


Figura 06: Esquema de coleta de amostras de sangue e avaliação de emergência folicular dos três grupos de tratamento do Experimento 02.

5.3.3. Análises de Progesterona.

As dosagens hormonais foram executadas por radioimunoensaio. Utilizou-se o *kit* comercial (Siemens Coat-a-count®) conforme metodologia descrita por Fernandes

(2000). As análises foram realizadas no Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Unesp-Botucatu.

5.3.4. Avaliações ultrasonográficas.

Iniciando no dia experimental três (D3), os animais foram examinados diariamente com o objetivo de acompanhar a emergência e o desenvolvimento inicial da nova onda folicular ovariana, até o D9, para a medição do maior folículo.

O crescimento folicular foi acompanhado pela mensuração do diâmetro (média de duas medidas perpendiculares da imagem do folículo) do maior folículo de cada ovário, em milímetros (mm) e com o mesmo equipamento utilizado na pré-sincronização.

5.4. Análises Estatísticas

No experimento 1, as médias de concentrações de progesterona nos diferentes dias de colheita, foram comparadas entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Esse mesmo tipo de análise foi feito no experimento 2, também para comparar as médias de concentrações de progesterona entre os tratamentos nos diferentes dias de colheita de sangue. Ainda no experimento 2, a frequência de ocorrência de animais com alguma dosagem de progesterona abaixo de 1ng/ml foi comparada entre os grupos utilizando-se o teste de χ^2 . O Diâmetro médio dos folículos foi comparado entre os dias de avaliação, entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Para todas as análises, utilizou-se o programa SAEG. Os dados com resultados abaixo de 5 % foram considerados como significativos e entre 5 e 10 %, como aproximação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento 01. Perfil de liberação de P4 de acordo com a atividade luteal.

Como esperado, os animais dos grupos G1a e G2a iniciaram o protocolo com quantidades maiores de P4 endógena em relação ao grupo G3a ($p < 0,05$). Não houve diferença na concentração de P4 entre G1a e G2a ($p > 0,05$), demonstrando a homogeneidade entre esses grupos. Conforme relatado por Inskip (2004), a concentração de progesterona deve ser maior que 1 ng/mL durante todo o protocolo, resultado semelhante ao descrito por Almeida et. al. (2006), que esclarecem a necessidade de P4 a níveis como os luteais durante o tratamento e Viana (2008) que caracteriza a liberação de P4 dos implantes como uma alternativa viável para manter esses níveis de P4. Lavy e colaboradores (2006), corroboram esse dado, ao descreverem os implantes como uma importante fonte de tratamento quando se desejam níveis elevados de progesterona. Em todos os grupos, a concentração de P4 esteve acima do mínimo necessário para os eventos fisiológicos. Com isso, verifica-se que na primeira utilização os implantes mantêm os níveis de P4 acima de 1 ng/mL.

A P4 média teve uma elevação expressiva após a colocação dos implantes apenas no grupo 3, conforme descrito na tabela 01, por meio da diferença entre a concentração plasmática de D3 e D0. Isso mostra que, em animais sem corpo lúteo, ou seja, com baixos níveis de progesterona circulante, o implante libera maior quantidade do hormônio para o animal.

Tabela 01. Perfil de liberação de progesterona (P4) em novilhas com diferentes condições de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo.

<i>Grupo</i>	<i>D0</i>	<i>D3</i>	<i>D5</i>	<i>D8</i>	<i>DIF D3-D0</i>
G1a (n=10)	5,3±3,1 ^a	5,8±2,7 ^a	3,4±1,7 ^a	3,2±1,3 ^a	0,5±1,8 ^b
G2a (n=10)	5,3±1,4 ^a	5,5±1,9 ^a	2,5±1,0 ^b	1,8±0,8 ^b	0,2±1,5 ^b
G3a (n=10)	0,6±0,3 ^b	3,6±0,8 ^b	2,1±0,7 ^b	1,6±0,6 ^b	2,8±1,0 ^a

a e b: Letras diferentes na mesma coluna indicam resultados com significância a 5 % de probabilidade

Animais de G1a e G2b mantiveram a P4 a níveis semelhantes e maiores que o G3a até que os animais do G2a recebessem o agente luteolítico que causou a queda da P4 endógena. Conforme observado pela diferença entre D3 e D0 (Tabela 01) e

pela curva de liberação entre os grupos na figura 01, a liberação de progesterona do implante dependeu da quantidade desse hormônio endógeno e foi diretamente proporcional ao gradiente de concentração, ou seja, diferença entre P4 no implante e no animal. Esse fenômeno é equivalente ao que foi descrito por Brunton & Parker (2008), a difusão passiva, um mecanismo de farmacocinética importante para o tratamento com esteroides, que caracteriza o transporte do ativo de acordo com o gradiente de concentração. Essa situação foi observada neste estudo, haja vista que os grupos 1 e 2 apresentavam concentrações luteais de progesterona no início do protocolo, ao contrário do grupo 3, sendo que os implantes utilizados neste último liberaram mais hormônio que os dos outros grupos, uma vez que eram a única fonte de progesterona dos animais. Rothen-Weinhold et al. 2000, relatam ainda que a mucosa vaginal possui elevada permeabilidade aos esteroides, reforçando a viabilidade da difusão passiva como mecanismo de liberação de progesterona a partir de implantes vaginais.

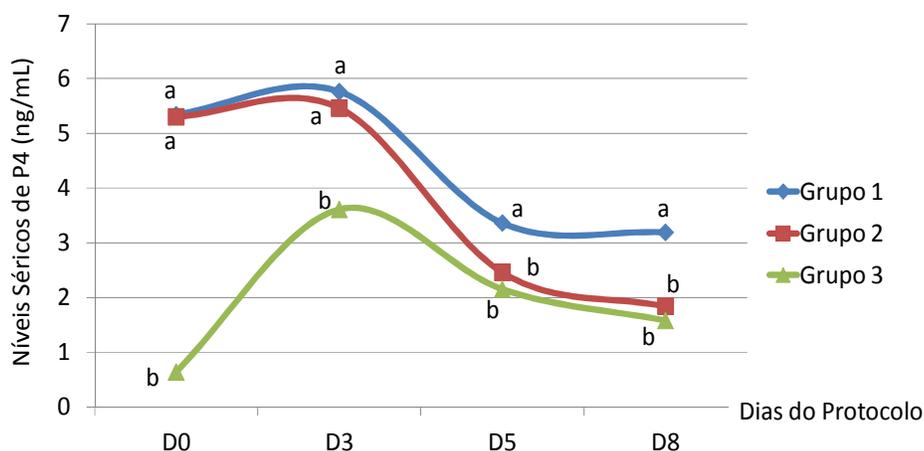


Figura 07. Perfil de liberação de progesterona (P4) em novilhas com diferentes condições de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo (Letras diferentes no mesma avaliação apresentam significância ($P < 0,05$)).

Após a aplicação do luteolítico, os animais com CL do grupo 2 (D3), que apresentavam perfil de progesterona semelhantes ao grupo 1, passaram a apresentar perfil de progesterona igual ao grupo 3 (Tabela 1). No entanto, essa mudança no perfil de liberação observado neste grupo necessita de algumas horas para que o gradiente de concentração se modifique e a liberação do ativo ocorra de maneira a promover um novo equilíbrio (Figura 1). Rothen-Weinhold et. al. (2000) também relataram que as

características dos implantes e da mucosa vaginal permitem elevação ou queda das concentrações de P4 em poucas horas após a colocação ou a retirada dos implantes.

A diferença da concentração do esteroide analisado entre D3 e D0 (Figura 2) complementa a evidência de que mais princípio ativo foi liberado dos dispositivos dos animais do grupo 3.

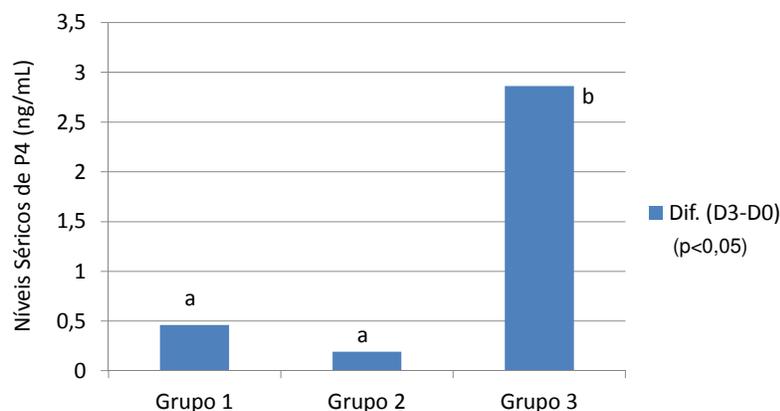


Figura 08. Diferença entre os dias 03 (D3) e zero (D0) quanto ao nível plasmático de progesterona (P4) de novilhas com diferentes condições de ciclicidade (com ou sem CL), tratadas com implante vaginal de 1 g novo.

Devido à liberação de P4 mais pronunciada do G3a, que não tinha CL e P4 endógena, em relação a G1a e G2a, que apresentavam CL (Figura 1), pelo fato de que a diferença de concentração entre D3 e D0 (Figura 2) e a aplicação de prostaglandina no D3 terem provocado a semelhança do G2a ao G3a, devido à retirada do CL deste grupo e de acordo com o que foi encontrado na literatura quanto às características da difusão passiva (Rothen-Weinhold et al. 2000 e Brunton & Parker em 2008), verifica-se que a quantidade de P4 liberada pelos implantes vaginais depende da condição de ciclicidade dos animais durante o tratamento.

Por outro lado, de acordo com o descrito por Sávio et. al. (1993), a P4 não deve atingir níveis inferiores a 1 ng/mL sanguíneo a fim de não permitir o pico de LH. Folmam et. al. (1973), Fonseca et. al. (1983) e Holness et. al. (1981) reforçam essa descrição ao relatar que vacas com níveis reduzidos de progesterona durante a fase luteal (abaixo de 1 ng/mL), que antecede a inseminação artificial, apresentam menores índices de fertilidade quando comparadas a vacas com níveis elevados desse hormônio. Assim, com base nos resultados obtidos neste experimento quanto ao perfil de liberação de P4, conclui-se que a utilização de implantes novos é suficiente para

suprimir o pico de LH durante o protocolo de IATF, independentemente da condição da P4 endógena dos animais submetidos a sincronização, porém a quantidade de progesterona liberada a partir desses dispositivos é influenciada pela concentração plasmática do hormônio endógeno.

6.2. Experimento 02. Perfil de liberação de P4 de implantes novos e previamente utilizados.

6.2.1. Perfil da liberação de Progesterona

Neste estudo, os animais iniciaram o tratamento sem a presença de CL e P4 circulante. Dessa forma, a única fonte de progesterona existente foi o dispositivo intravaginal, que por sua vez foi previamente utilizado em animais com diferentes condições de progesterona endógena. Com isso, conforme observado na Figura 03, o perfil de liberação representado pela média entre os animais dos grupos não apresentou diferença significativa.

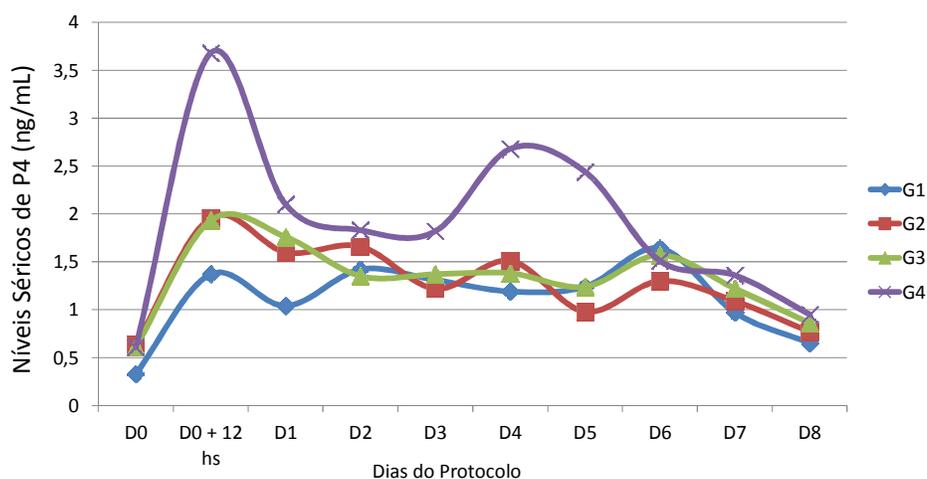


Figura 09. Curva de liberação média de progesterona (P4) a partir de implantes previamente utilizados em diferentes situações (animais com e sem CL), em novilhas sem a presença de corpo lúteo

Os resultados obtidos entre os grupos não demonstraram significância no percentual de animais que estiveram abaixo de 1 ng/mL sanguíneo de progesterona em pelo menos uma das nove amostras de sangue coletadas (Tabela 02). Além disso, conforme demonstrado na Tabela 03, o número e o percentual de amostras que se apresentaram com valores séricos menores que o descrito anteriormente em relação

ao total de oportunidades analisadas também não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Tabela 02. Porcentagem de animais com P4 menor que 1ng/ml de sangue em pelo menos uma das amostras coletadas.

Grupo	Total (n)	P4 < 1 ng/mL	%
1	6	1	16,7
2	6	4	66,0
3	6	3	50,0
4	3	0	0

P=0,14

Entretanto, o grupo 04 que recebeu implantes de progesterona novos não apresentou animais com P4 menor que 1 ng/mL em nenhum dos parâmetros avaliados anteriormente. Devido ao fato de que neste estudo todos os grupos foram compostos por animais sem a presença de CL e os implantes de cada grupo terem sido usados previamente em diferentes situações (novilhas com e sem CL), observa-se que não houve padrão de liberação de P4 a partir dos implantes reutilizados, uma vez que os animais do grupo 01, cujos implantes foram utilizados pela primeira vez em vacas com corpo lúteo, obtiveram o mesmo número de ocorrência do esteroide abaixo da referência, quando comparado ao grupo 03, que teve sua primeira utilização em animais sem CL. Essa relação entre os resultados deste experimento e a não padronização da liberação de P4 se dá pela observação conclusiva do Experimento 01 deste estudo.

Tabela 03. Número e porcentagem de amostras com P4 menor que 1ng/ml em relação ao número total avaliado

Grupo	Total (n)	P4 < 1 ng/mL	%
1	48	6	12,5
2	48	11	22,9
3	48	6	12,5
4	24	0	0

P=0,07

A diminuição da concentração do esteroide analisado a níveis mais baixos que o valor estabelecido como referência, aconteceu por diversas vezes durante o protocolo de tratamento (Tabela 04), mesmo considerando a média da curva do hormônio entre os animais do mesmo grupo (Figura 04). Conforme descrito por Inskeep (2004), a ocorrência de um nível de progesterona abaixo de 1 ng/mL de sangue pode ocasionar a maturação precoce do folículo e do oócito, por consequência o aumento da frequência dos pulsos de LH, relatando ainda que a concentração de P4 é responsável por 37% da variação da frequência dos pulsos desse gonadotrofina. Xu

et. al. (1997) observaram que a P4 baixa no período de emergência da onda folicular resulta em menores taxas de gestação após a inseminação artificial.

Apesar dos resultados expostos nas Tabelas 02 e 03 não apresentarem significância entre os grupos, observa-se uma forte tendência ($p=0,07$) de incapacidade dos implantes reutilizados manterem níveis adequados (acima de 1 ng/mL) de P4 durante os tratamentos. Supõe-se que, em populações maiores, como os encontrados comumente a campo nas fazendas de corte que utilizam protocolos de IATF. Se esse perfil se repetir, a característica das vacas durante a primeira utilização dos implantes, até mesmo pelo que foi descrito no Experimento 01, pode interferir na sincronização dos animais tratados e na taxa de concepção quando se reutilizam esses dispositivos.

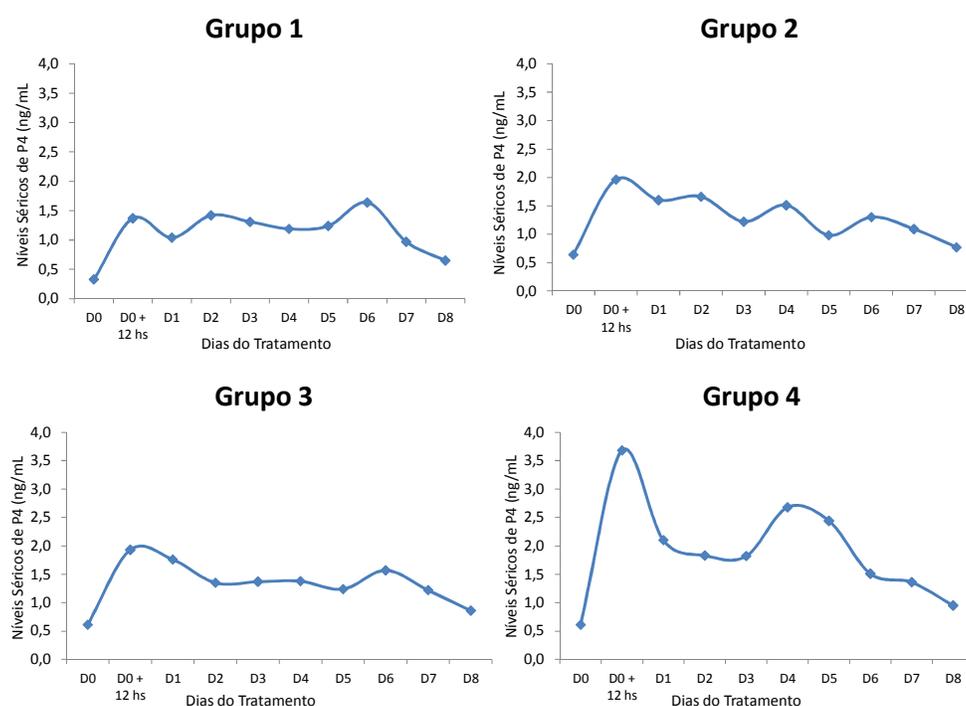


Figura 10. Curva de liberação média de progesterona (P4) a partir de implantes previamente utilizados em diferentes situações (animais com e sem CL), em novilhas sem a presença de corpo lúteo.

Outros autores como Rivera et. al. (2011) corroboram esses dados ao descreverem que vacas superovuladas na segunda onda de desenvolvimento folicular, em que a P4 apresenta níveis séricos mais elevados, obtiveram embriões com qualidade superior quando comparadas àquelas superestimuladas na primeira onda (entre 5 e nove dias no último cio), com menores concentrações desse esteroides. Além deste, Folman et al. (1973); (1990); Fonseca et al. (1983); Holness et al. (1981)

reafirmaram essa descrição, relatando que vacas com níveis reduzidos de P4 durante a fase luteal do ciclo estral que antecede a inseminação artificial apresentam índices de fertilidade menores que vacas com elevadas concentrações desse hormônio na mesma fase. Nesses estudos, a P4 foi secretada pela presença de um corpo lúteo, resultando em uma curva de concentração plasmática de progesterona, que, embora baixa, foi crescente durante a primeira parte do ciclo estral.

Tabela 04. Concentração média (\pm desvio padrão) diária de progesterona (P4) durante o protocolo nos animais recebendo implantes novos ou previamente utilizados.

Grupo	Total (n)	Media \pm desvio padrão*
1	54	1,2 \pm 0,6 ^a
2	54	1,3 \pm 0,6 ^a
3	54	1,4 \pm 0,6 ^a
4	27	2,0 \pm 0,9 ^b

*P<0,001

Em outros estudos, quando o corpo lúteo foi eliminado através da aplicação de PGF2 α e os dispositivos de P4 foram inseridos na vagina, promovendo concentrações baixas e lineares ou com curva baixa e decrescente, foram obtidas taxas consideravelmente menores de viabilidade oocitária (REVAH and BUTLER, 1996), sobrevivência embrionária (AHMAD et al., 1995) e de gestação (COOPERATIVE PROJECT, 1996; MIHM et al., 1994; SAVIO et al., 1993; SMITH and STEVENSON, 1995). Nesses e em outros estudos (ADAMS et al., 1992; KINDER et al., 1996; SIROIS and FORTUNE, 1990), o folículo dominante manteve-se por um longo período, tornando-se persistente e suprimindo o crescimento de outros folículos. O decréscimo na fertilidade foi atribuído à dominância prolongada desse folículo, possivelmente por intermédio da maturação prematura do oócito (MIHM et al., 1999; REVAH and BUTLER, 1996).

Almeida e colaboradores (2006) indicam a reutilização dos implantes como uma alternativa interessante para melhorar a viabilidade dos protocolos. Bó e Cutaia (1998) obtiveram resultados 10% maiores com implante usado pela segunda vez quando comparado com o mesmo dispositivo novo (59,7 % e 49,5 respec.) enquanto Rocha et. al. (2007) obtiveram resultados decrescentes, porém satisfatórios, a partir do primeiro até o terceiro uso dos dispositivos (58,06 %, 56,52 % e 52 % respec.). Apesar das diferenças numéricas, os dados não mencionam a quantidade de P4 circulante, além disso, não fazem referência quanto à característica de ciclicidade dos animais sincronizados, haja vista que animais cíclicos apresentam resultados

superiores quando submetidos a protocolos de IATF (CUNHA et al, 2013). Ainda nesse contexto, se os animais submetidos ao segundo e terceiro uso dos implantes foram aqueles que não engravidaram no primeiro uso, devido ao estímulo provocado pela combinação hormonal, esperadamente estariam ciclando e em melhores condições que no 1º uso. (CUNHA et al, 2013).

Ao considerar a dosagem de progesterona durante todos os dias do protocolo hormonal (Tabela 04), os implantes novos apresentaram maior liberação de progesterona, levando à maior média de concentração desse esteroide em relação aos implantes previamente utilizados ($P < 0,001$). Situação que reforça a existência de diferença no perfil de progesterona nos animais tratados com implantes novos ou reutilizados. Em relação aos implantes reutilizados, em que o primeiro uso foi feito em animais de diferentes situações fisiológicas, não houve diferença nas concentrações de P4 ($P > 0,05$). Isso mostra que, independentemente do tipo de animal no qual foi feita a primeira utilização, a reutilização desses dispositivos leva a um perfil de progesterona inferior àquele provocado pela utilização de um implante novo.

Pelos resultados apresentados, não houve diferença na liberação de P4 dos implantes reutilizados, oriundos de animais em diferentes condições de ciclicidade. No entanto, fica evidente que não houve padrão na liberação desse hormônio, quando se observou que, por diversas vezes, o esteroide esteve abaixo de 1 ng/mL mesmo na presença do dispositivo e quando se observam os grupos G1b, G2b e G3b que utilizaram implantes usados anteriormente e se comparou com o G4b que receberam implantes novos e não demonstraram essa característica. Além disso, devido ao pequeno número de animais dos grupos, aos resultados do Experimento 01, a literatura existente e considerando o valor da probabilidade estatística, pode-se supor que, em um grande número de animais tratados, fêmeas sem a presença de CL que receberam implantes previamente utilizados em matrizes com a mesma característica podem ter sua fertilidade comprometida.

6.2.2. Influência da Curva de Progesterona na Dinâmica Folicular

Dois animais do grupo 01 e três animais dos grupos 02 e 03, apresentaram uma ligeira regressão no diâmetro folicular em algum momento do tratamento, seguida de retomada do crescimento conforme demonstrado na Tabela 05. No entanto, a taxa de crescimento folicular a partir da emergência foi a mesma para os quatro grupos de tratamentos.

Tabela 05. Dinâmica folicular (mm) de novilhas sem corpo lúteo tratadas com implantes utilizados previamente em diferentes condições de ciclicidade (com e sem CL).

Grupo	D0	D3	D4	D5	D6	D7	D8	Tx de Cresc. Fol. D3 ao D8 (mm/dia)
Média G1	7,0	7,8	8,0	8,2	9,2	10,7	13,0	1,0
Média G2	5,8	7,0	7,8	8,3	9,3	10,3	12,0	1,0
Média G3	6,5	7,2	6,6	7,6	8,8	9,8	10,5	0,7
Média G4	7,6	7,2	7,3	7,6	9,0	10,5	11,4	0,8

p>0,05

A curva de crescimento do folículo dominante também apresentou a mesma tendência entre os grupos quando os animais foram avaliados individualmente (Figura 5), assim como quando se analisa a média de desenvolvimento dessa estrutura avaliando os dados agrupados entre os grupos (Tabela 5).

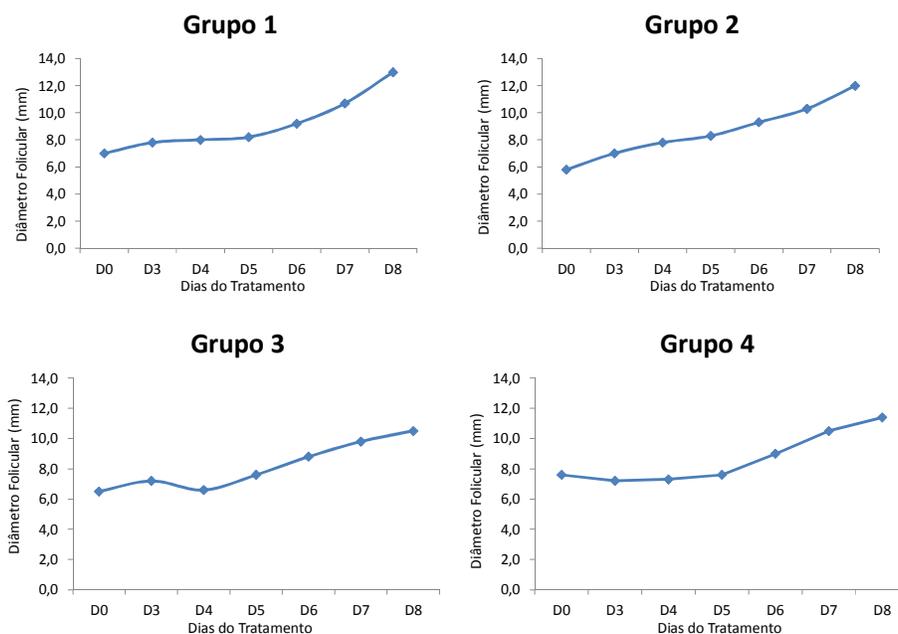


Figura 11. Avaliação individual da curva de crescimento folicular de novilhas sem corpo lúteo, tratadas com implantes usados previamente em animais em diferentes condições de ciclicidade.(com e sem CL).

Com base nos resultados encontrados, percebe-se que não houve influência da variação observada na liberação da P4 sobre o desenvolvimento folicular dos animais nos quatro grupos de tratamentos. Essa observação é reforçada pelo fato de que o diâmetro médio dos folículos no D8 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 05), porém em todos eles o folículo dominante já estava com capacidade ovulatória na mesma ocasião (Vaz et. al. 2012).

De acordo com Cipriano et. al. (2011), níveis baixos ou elevados de progesterona em novilhas zebuínas sofreram alterações na concentração sérica das gonadotrofinas (FSH e LH), porém o padrão de crescimento folicular e a taxa de ovulação não diferiram entre os grupos avaliados. Neste estudo, não foi avaliada a taxa de gestação dos animais nos diferentes grupos, mas resultados semelhantes foram encontrados em relação ao desenvolvimento folicular e diâmetro ao final do protocolo.

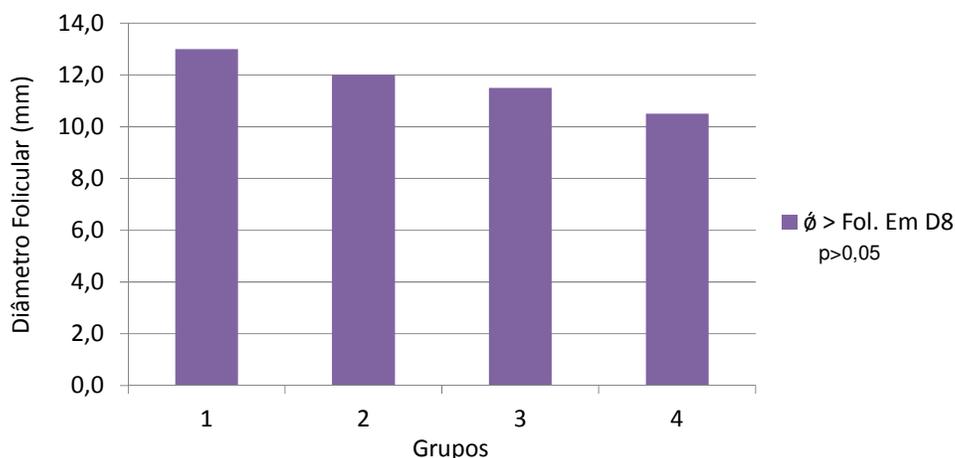


Figura 12. Diâmetro médio do maior folículo no final do protocolo de novilhas sem corpo lúteo, tratadas com implantes previamente utilizados em diferentes condições de ciclicidade (com e sem CL).

Devido às características do delineamento experimental deste estudo, quanto à avaliação do desenvolvimento folicular em relação ao padrão de liberação de progesterona, os resultados descritos em diversos trabalhos (Folman et al., 1973; 1990; Fonseca et al., 1983; HOLNESS et al., 1981; INSKEEP, 2004; XU et. al., 1997; RIVERA et. al., 2011; REVAH and BUTLER, 1996; AHMAD et al., 1995; COOPERATIVE PROJECT, 1996; MIHM et al., 1994; SAVIO et al., 1993; SMITH and STEVENSON, 1995; ADAMS et al., 1992; KINDER et al., 1996; SIROIS and FORTUNE, 1990; MIHM et al., 1999; REVAH and BUTLER, 1996) não foram observados neste trabalho. No entanto, não é possível concluir que esses folículos, cujos padrões de desenvolvimento não foram alterados, manterão a viabilidade e, conseqüentemente, a fertilidade, devido às diversas ocorrências de P4 abaixo de 1 ng/mL de sangue. Assim, pelos resultados alcançados na avaliação do desenvolvimento folicular, devido à ausência de padrão de liberação e de segurança da manutenção de níveis adequados de progesterona e pelos resultados encontrados na literatura consultada, supõe-se que a reutilização de dispositivos intravaginais de P4 depende diretamente do conhecimento sobre a atividade ovariana da matriz que o

utilizou pela primeira vez, para que se tenha segurança de que os níveis séricos desse esteroide não ultrapassarão o limite mínimo de circulação sanguínea, haja vista que, conforme descrito no experimento 01, a liberação desse hormônio dos implantes depende de sua concentração no organismo do animal tratado.

7 CONCLUSÕES

A quantidade de P4 liberada pelo implante intravaginal depende diretamente da concentração endógena desse esteroide;

Implantes de P4 novos mantêm níveis satisfatórios de P4 para a IATF, independentemente da condição fisiológica da fêmea tratada.

Implantes reutilizados oriundos de animais em diferentes condições de ciclicidade não mantêm perfis de progesterona semelhantes àsquelas do uso prévio (1º uso).

A dinâmica folicular não foi alterada em função da ausência de padrão na liberação de P4 dos implantes reutilizados quando comparados a implantes novos.

Implantes novos, a despeito da maior liberação de progesterona, não interferem no padrão de desenvolvimento folicular em novilhas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P., MATTERI, R.L.; GINTHER, O.L. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle stimulating hormone in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v. 96, n 2, p.627–640, nov.1992.

AHMAD, N. et al. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biol. Reprod.**, v. 52, n. 5 p.1129–1135, may 1995.

ALMEIDA, A. B. et al. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomel associados ao valerato ou benzoato de estradiol em vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 456-465, abr. 2006.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial - *ÍNDICE ASBIA*, Importação, Exportação e Comercialização de Sêmem, 2012.

BARUSELLI P. S. et. al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004b. p. 155-165.

BO, G. A. et al. Programas de inseminación artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 56-81.

BÓ, G. A. L.; CUTAIA, L. **Estado del en IATF** : factores que afectan SUS resultados: *Resúmenes de estudios de reproducción Animal*. Córdoba (IRAC), Universidad Católica de Córdoba, 1998. 18 p.

BRUNTON, L.L.; PARKER, K.L. **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. 4.ed. Chicago : McGraw-Hill, 2008.1254 p.

CIPRIANO, R.S. et al. LH and FSH concentration and follicular development in Nelore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n.1-2, p.16– 22, aug.2011.

COOPERATIVE REGIONAL RESEARCH PROJECT, NE-1612. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. **J. Anim. Sci.**, United States, v. 74, n. 8, p.1943–1952, aug. 1996.

COLAZO, M. G. et al. Resynchronization of estrus in beef cattle: ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 48, n.1, p. 49-56, mar. 2007.

COSTA, D.S. et al. Sincronização da onda folicular com busarelina previa a indução da luteólise com cloprostenol em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.28, n.6 p. 1243-1247, nov/dez.1999.

CUNHA, R.R. et al. Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Primíparas Nelore Lactantes Acíclicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.65, n.2, p.415-420, fev..2013.

DOGİ, F. C. **Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino**. Disponível em: <<http://www.produccion-animal.com.ar/>>. Acesso em: 22 jun. 2009.

FERNANDES, C.A.C.; FERREIRA A.M., FIGUEIREDO, A.C.S. Sincronização de Estro em Bovinos de Acordo com a Fase do Ciclo Estral. **Journal of veterinary Science**, , Niteroi, v.4, n.3, 107-109, mar.1997.

FOLMAN, Y., M. et al. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows on two levels of nutrition. **J. Reprod. Fertil.**, England, v.34, p.267–278, aug.1973.

FOLMAN, Y., M. et al. Comparison of methods for synchronization of estrous cycles of dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.73, n 10, p.2817–2825, oct.1990.

FONSECA, F. A. et al. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrous, conception rate and days open. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.66, n 5, p.1128–1147, may 1983.

HOLNESS, D. H. et al. Studies on plasma progesterone concentrations and fertility in Friesland dairy cows during the post-partum period. **Journal Animal Science**, Champaign, v.97, n. 2, p.649–655, aug.1981.

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, n. E-suppl, p. E24–E39, 2004.

KINDER, J. E., et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p.1424–1440, jun.1996.

LAVY E., STEINMAN A., SOBACK S. Oral controlled-release formulation in veterinary medicine. **Crit Rev Drug Carrier Syst** , United States, v.23, n. 3, p.165–204, 2006.

LUCY, M. C. et al. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 495-512, jul. 2004.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, n.1-4, p.1-25, oct.1993.

MADUREIRA, E. H. et. al. *Sincronização com progestágenos*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 117-128.

MIHM, M. et al.. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **J. Reprod. Fertil.**, England, v.102,n. 1, p.123–130, sept.1994.

MIHM, M., et al. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin on oocyte maturation in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, England, v. 116,n. 2, p.293–304, Jul.1999.

MOTOMELO, K. C. et al. Synchronization of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research**, United States, v. 45, n.1, p. 45-49, jul. 2002.

REVAH, I., ; W. R. BUTLER. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of ovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, England, v. 106, n. 1, p.39–47, jan.1996.

RIVERA F. A. et al. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduccion**, England, v. 141, n. 3, p. 333-342, mar. 2011.

ROCHA J. M. et al. IATF em vacas Nelore: avaliação das duas doses de ecG e reutilização de implantes intravaginais de progesterona. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 40-47, jan/jun. 2007.

ROTHEN-WEINHOLD A., GURNEY R., DAHN M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharm Sci Technol Today**, United States, v.3, n. 7, p.222–231, jul.2000.

SAVIO, J. D. et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, England, v. 98, n. 1, p. 77-84, may 1993.

SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Two methods of inducing low plasma progesterone concentrations have different effects on dominant follicles in cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p.2771–2778, dec.2000.

SENGER P. L. **Pathways to pregnancy and Parturition**. 2.ed. rev. [S.l.: s.n.], 2003.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, United States, v. 127, n. 2, p.916–925, aug. 1990.

SMITH, M. W. ; J. S. STEVENSON. Fate of the dominant follicle, embryonic survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F₂ α and progestins in the absence or presence of functional corpus luteum. **J. Anim. Sci.**, United States v. 73, n. 12, p.3743–3751, dec.1995.

SOLORZANO, C. W. et al. Pregnancy rates after estrus synchronization treatment with new and reused CIDR-B devices. **Reproduction, Fertility and Development**, Portland, Oregon, v. 16, n. 2, p. 214, jan. 2004.

THOMAS, V. M. **Beef Cattle production**. 3. ed. London: Wave Land Press, 1992. p.348.

VIANNA, G.N.O. et al. Comparação de diferentes protocolos para a sincronização de estro e inseminação artificial em tempo fixo em vacas da raça nelore em anestro pós-parto. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v.13, n.4, p.247-254, abr. 2008.

MARTINEZ, M.F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, United States, v.54, n. 4, p. 757-769, sept. 2000.

PALHAO, M.P. et al. Follicle and hormone dynamics in single versus double ovulating heifers. **Reproduction**, England, v.138, n. 3, p. 561-570, sept. 2009.

XU ZZ; BURTON LJ ; MACMILLAN KL. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF₂a and progesterone. **Theriogenology**, United States, v.47, n. 3, p. 687–701, feb.1997.