

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
AECIO SILVEIRA RAYMUNDY

**RESSINCRONIZAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA AUMENTAR A
EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS**

Alfenas – MG

2016

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
AECIO SILVEIRA RAYMUNDY

**RESSINCRONIZAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA AUMENTAR A
EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Mestrado de Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas – MG

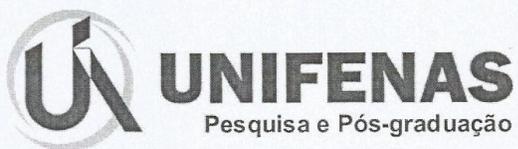
2016

Raymundy, Aécio Silveira
Ressincronização como ferramenta para aumentar a eficiência da
utilização de receptoras de embriões bovinos. — Aécio Silveira
Raymundy.—Alfenas, 2016.
59 f.

Orientador: Prof.Dr Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal -Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.

1. Hormônios 2. Fertilização in vitro 3. Taxa de gestação
I. Universidade José do Rosário VellanoII. Título

CDU : 636.082:636.2(043)



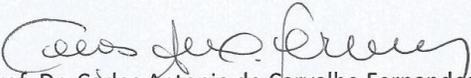
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “RESSINCRONIZAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS”.

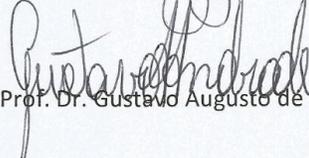
Autor: Aécio Silveira Raymundy

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes

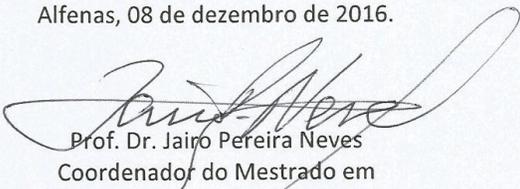
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA – REPRODUÇÃO ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes
Orientador


Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia


Prof. Dr. Gustavo Augusto de Andrade

Alfenas, 08 de dezembro de 2016.


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Mestrado em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado em minha vida a oportunidade de cursar esta pós-graduação. Agradeço aos meus pais, amigos e namorada que de certo modo me apóiam nas horas em que preciso. Gratidão também aos colegas da pós-graduação, os quais foram motivação no dia a dia, tornando as dificuldades mais fáceis de serem superadas. Agradeço a todos os professores da pós-graduação de reprodução, sanidade e bem-estar animal, que se dispuseram a dividir seus conhecimentos com seus alunos, de modo especial ao professor orientador Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pela atenção atribuída a este trabalho, e aos componentes da banca avaliadora. Finalizando, agradeço também à BIONTRAN, à CAPES e ao CNPQ, pelas parcerias indispensáveis para a realização deste projeto.

RESUMO

Aécio Silveira Raymundy. **Ressincronização como ferramenta para aumentar a eficiência da utilização de receptoras de embriões bovinos.** Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal)-UNIFENAS, 2016.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo de ressincronização na taxa de prenhez em novilhas mestiças utilizadas como receptoras de embrião. Este experimento foi desenvolvido em uma fazenda localizada no sudoeste de Minas Gerais. Foi composto de duas etapas: **Experimento 1:** Visou avaliar a eficiência de 1mg de benzoato de estradiol (BE) na sincronização da onda de desenvolvimento folicular. Foram utilizadas 40 fêmeas mestiças divididas em dois grupos. **G1** - 1mg de BE; e **G2** - 1 ml de soro fisiológico. As alterações da dinâmica folicular foram acompanhadas por ultrassonografia. A Aplicação de 1mg de BE se mostrou eficiente (95%) na sincronização do desenvolvimento folicular. No **experimento 2**, foram produzidos 275 embriões in vitro (PIV), utilizando doadoras Gir (*Bostaurus indicus*) e sêmen sexado da raça holandês. A transferência de embriões foi sincronizada por meio de um protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF): D0: dispositivo intravaginal de progesterona- DIP (Prociclar - Brasil) mais 0,5 mg de benzoato de estradiol - BE IM; D8: remover DIP mais 0,5 mg de cipionato de estradiol - CE IM e 0,15mg de D-Cloprostenol. No dia da transferência de embriões (D17), as receptoras foram avaliadas por ultrassom (Mindray - M5). Catorze dias após a transferência de embriões (TE), as receptoras foram divididas aleatoriamente em dois grupos: G1 (n = 137) início do protocolo ressincronização com a inserção de um DIP e aplicação de 1 mg de BE, e G2 (n = 138) não foi tratada. Esse procedimento foi desenvolvido para avaliar o efeito da aplicação de estradiol no início da prenhez. Oito dias mais tarde, todas as receptoras foram novamente avaliadas por ultrassom para diagnóstico de gestação. Nas fêmeas gestantes do G1, só foi removido o DIP. As fêmeas não gestantes nesse grupo receberam 0,5 mg de CE e 0,15 mg de D-Cloprostenol IM e DIP foi removido. Dez dias depois, foram novamente avaliadas e aquelas capazes foram inovuladas. No G2, o início do segundo protocolo TETF só começa depois do diagnóstico de não prenhe. Foi comparada por X^2 a taxa de prenhez após a primeira e a segunda transferência de embriões e o número de receptoras grávidas aos 30 e 45 dias. A taxa de

prenhez após a primeira TE não teve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ – 49,6% vs 48,6% para G1 e G2, respectivamente). Esse resultado confirma que a inserção de um DIP e a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol em vacas no início da prenhez não interfere na manutenção da gestação. Também não houve diferença na taxa de prenhez após a segunda TE ($P > 0,05$ – 47,8% vs 45,1% para G1 e G2, respectivamente). Conclui-se que o protocolo de ressincronização utilizado não interfere na manutenção da gestação precoce em receptoras e pode antecipar a gestação, permitindo que receptoras emprenhem num curto período de tempo.

Palavras Chave: Hormônios, fertilização in vitro, taxa de gestação.

ABSTRACT

AécioSilveiraRaymundy. **Resynchronization as a tool for Increase the efficiency of the use of bovine embryo recipients.** Advisor: Carlos Antônio de CarvalhoFernandes. 2016. 65 f. Dissertation (Masters in Reproduction, Health and Animal Welfare)- UNIFENAS, 2016.

The objective of this study was to evaluate the efficiency of a resynchronization protocol, in the rate of pregnancy in mixed breed cattle; used as embryo recipients. This study was conducted on a farm in the southeastern part of Minas Gerais – Brazil, and it was divided into two experiments: Experiment 1: It had the purpose of evaluating the efficiency of the administration of - 1mg estradiol benzoate (BE) on the synchronization of cycle waves and follicular development. Therefore, 40 mixed breed cows were divided into two groups; G1 – received 1mg of estradiol benzoate; While G2 – received 1ml of physiologic serum. The follicular development was observed through ultrasound imaging, proved to be efficient in (95%) of the synchronization and follicular and development. Experiment 2: 275 in vitro embryos (PIV) were developed using Gir (BosTaurosInducus) oocytes and Holstains cattle sexed semen. The embryo transfers were synchronized through a protocol of embryo transfer in fixed time (TETF). Day 0: insertion of progesterone implants DIP (Prociclar – Brazil), added to 0,5mg Estradiol Benzoate (BE) IM; Day 8 – Removal of DIP implants and administration of 0,5mg of Estradiol Cypionate CE (IM) and 0,15mg of D Cloprostenol on the day of the embryo transfers (D17) – All recipient animals were examined through ultrasound (Midday – M5). Fourteen days after the embryo transfer (TE) the animals were randomly divided in two groups: G1 (n 137) began the protocol of resynchronization with the insertion of the DIP implants and the application of 1mg Estradiol Benzoate (BE), and the animals from G2 (n 138) were not treated. This procedure was developed to evaluate the effects of the application of estradiol in the beginning of the pregnancy. Eight days later, all recipients were once again evaluated through ultrasound for diagnose of pregnancy. On the pregnant recipients of G1 only the

DIP implants were removed, while the non pregnant recipients received 0,5mg of CE, and 0,15mg D-Cloprostenol IM and the implant (DIP) was also removed. Ten days later these animals were evaluated again, and those found capable were unovulated. On G2 was established a second TETF protocol beginning just after the confirmation of non pregnancy. It was compared to X² the rate of pregnancy after first and second embryo transfers and the number of pregnant recipients on 30 and 45 days. The rate of pregnancy after the first embryo transfer (TE) presented no difference between the groups ($p > 0,05$ – 47,8% vs 45,1% for G1 and G2 respectively). Therefore we can conclude that the protocol of resynchronization does not interfere in the maintenance of early pregnancy in recipients and can anticipate a pregnancy, allowing the recipients to become pregnant in a short period of time.

Key words: Hormones, In Vitro fertilization, pregnancy rate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema de tratamento dos animais nos diferentes grupos.....47
- Figura 2** – Variação média do maior folículo após a aplicação dos tratamentos com benzoato de estradiol ou soro fisiológico.....50
- Figura 3** – Evolução da porcentagem de vacas gestantes.....53

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Eficiência média de sincronização do desenvolvimento folicular nos animais de diferentes categorias e em conjunto..... | 49 |
| Tabela 2 –Taxa de gestação de receptoras de embrião após a 1ª inovulação, nos diferentes tratamentos ressincronizados (RESS) e controle (CONT)..... | 51 |
| Tabela 3 -Taxa de gestação de receptoras de embrião após a 2ª inovulação, nos diferentes tratamentos ressincronizados (RESS) e controle (CONT)..... | 52 |
| Tabela 4 – Simulação de resultados financeiros utilizando os dados de taxa de gestação obtidos no tratamento ressincronizado..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de estradiol

CE – Cipionato de estradiol

CL – Corpo lúteo

CONT – Controle

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DIP – Dispositivo intravaginal de progesterona

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

ECP – Cipionato de estradiol

FSH – Hormônio folículo estimulante

G1 – Grupo 1

G2 – Grupo 2

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

HPB – Holandês de preto e branco

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

IM – Intramuscular

INT-T – Intérferon-tal

LH – Hormônio luteinizante

OT – Ocitocina

P4 – Progesterona

PGF2 α – Prostaglandina

PIB – Produto interno bruto

PIVE – Produção in vitro de embrião

RES – Ressincronizado

SF – Soro fisiológico

TE – Transferência de embrião

TETF – Transferência de embrião em tempo fixo

VS – Versus

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 16 |
| 2. | OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3.1 | Produção de Embriões no Brasil | 18 |
| 3.2 | Sincronização de estro e ovulação | 19 |
| 3.2.1 | Progesterona e progestágenos | 21 |
| 3.2.2 | Estradiol | 22 |
| 3.2.3. | Gonadotrofinas..... | 24 |
| 3.2.4 | Prostaglandinas e análogos | 25 |
| 3.2.5 | Hormônio liberador de gonadotrofinas | 26 |
| 3.2.6 | Ressincronização | 26 |
| 4 | REFERÊNCIAS..... | 30 |
| 5 | CAPÍTULO 2. Manuscrito a ser enviado à revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia | 41 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ao longo dos últimos anos, o uso de novas tecnologias, especialmente, as relacionadas com a criação de animais tornaram-se de grande importância para a melhoria da produção agrícola no mundo.

A agropecuária foi o setor do país que mais cresceu nos últimos dez anos. Em 2013, registrou um avanço de 7,47%, enquanto o PIB geral do País ficou em 2,52%. Em 2014 e em 2015, continuou a crescer, enquanto o PIB geral do País ainda regredia. Considerando o perfil produtivo dos diferentes estados, Minas Gerais se destaca pela produção de leite. A atividade ocupa lugar de relevância no agronegócio mineiro. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, sendo responsável por 28% da produção nacional, e possui o segundo maior rebanho do País, com cerca de 19,6 milhões de cabeças. A cadeia produtiva leiteira é uma das atividades mais importantes no Estado, presente em todas as regiões, empregando mão-de-obra (576 mil empregos diretos), gerando excedentes comerciais, com um faturamento próximo a R\$ 2,4 bilhões e garantindo renda para grande parte da população mineira. A pecuária leiteira de Minas Gerais, em sua maioria, é composta por pequenos produtores, visto que mais de 75% do volume de leite é originado dessas pequenas propriedades, que produzem até 300 litros/dia. Infelizmente, a maioria dessas propriedades está à margem das tecnologias disponíveis para o setor. A melhoria da eficiência técnica e econômica dessas tecnologias poderia viabilizar o uso para pequenos produtores.

O custo de manutenção de receptoras está entre as principais limitações na utilização das biotécnicas por embriões. A utilização racional desses animais interfere diretamente na viabilidade econômica dos projetos. Reduzir o tempo em que cada receptora permanece vazia, diminuindo o tempo para sua reutilização após uma inóculo sem sucesso, é imprescindível para que se tenha sucesso técnico e econômico.

Dentre as alternativas existentes para resolver ou contornar essa situação, são duas as principais: 1) A antecipação do diagnóstico de gestação, utilizando a

tecnologia Doppler Colorido, que pode diagnosticar as fêmeas não gestantes 20 dias após a inseminação. O emprego dessa tecnologia é limitado pelo custo do equipamento e pela necessidade da quase onipresença do técnico na propriedade, visto que o diagnóstico precisa ser feito num período de 13 a 14 dias após cada inovulação. 2) Protocolos de ressincronização com status de prenhez desconhecida. Nesse caso, inicia-se o novo protocolo de TETF antes mesmo do diagnóstico de gestação, que deverá ser feito ao final desse protocolo, indicando as fêmeas não gestantes e possibilitando a reutilização destas, poucos dias mais tarde. Com esse procedimento, o intervalo de inovulações pode ser reduzido e, com isso, melhorada a eficiência reprodutiva. São vários os protocolos propostos, assim como os resultados existentes na literatura, principalmente para a IATF. A verificação da adequação técnica e econômica desses protocolos para as receptoras é o motivo do trabalho em questão

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de ressincronização para receptoras de embrião, visando melhoria de eficiência técnica e econômica de programas de multiplicação genética em bovinos.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar a eficiência de uma dose reduzida de benzoato de estradiol, na sincronização da onda de desenvolvimento folicular em fêmeas bovinas;
- Verificar se esse produto é seguro para a utilização em um protocolo de ressincronização em receptoras de embrião com situação de gestação desconhecida;
- Gerar inovação tecnológica para a melhoria de eficiência da atividade;
- Gerar informações para a criação e para a aplicação imediata desse protocolo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de Embriões no Brasil

O Brasil é o País onde a Tecnologia de embriões mais evoluiu, na espécie bovina, nos últimos 10 anos. Esta situação se explica, pois, além de um grande rebanho bovino, existe grande necessidade de animais geneticamente superiores (Viana et al., 2010). Para a multiplicação de genótipos superiores, a técnica de Produção In Vitro de Embriões (PIVE) é a que permite obter os melhores resultados e em um curto período. Apenas em 2012, foram produzidos e transferidos no Brasil mais de 350.000 embriões de PIVE. Essa técnica movimenta anualmente, apenas na espécie bovina, mais de R\$80 milhões. Estima-se que o valor dos produtos gerados ultrapasse R\$170 milhões/ano. Embora experimentando apreciável crescimento, a utilização da tecnologia de embriões, visando à multiplicação de genótipos superiores, é pequena, ao se considerar que o País possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (mais de 190 milhões de cabeças).

Em um programa de multiplicação genética de bovinos por embriões, os custos de manutenção de receptoras estão entre os principais, além do fato de que a oferta destes animais em quantidade e em qualidade é um dos principais fatores limitantes à disseminação da PIVE (Viana et al., 2010). Alternativas têm sido observadas, principalmente em rebanhos leiteiros, para minimizar esses impactos econômicos e para aumentar a disponibilidade de receptoras de embrião. No Brasil, cada vez mais, utilizam-se como receptoras fêmeas geneticamente inferiores, pertencentes ao próprio rebanho leiteiro onde o programa de TE é desenvolvido. Dessa forma, aumenta a importância do desempenho reprodutivo, visto que as fêmeas utilizadas como receptoras têm, nesse modelo, a função da manutenção da produção de leite da propriedade.

Diante desse cenário, a eficiência reprodutiva das receptoras ficou ainda mais importante. Para evitar perdas, alternativas tem sido propostas, visando ao uso racional das fêmeas que recebem os embriões. Os protocolos de

ressincronização, embora em baixa escala, já utilizados para aumentar a taxa de animais servidos em programas de inseminação artificial (IA), podem ser também aplicados quando as fêmeas são servidas com embriões em um programa de TE. Na ressincronização, o novo protocolo é iniciado mesmo antes do diagnóstico de gestação, visando ao ganho de tempo com redução no tempo que as fêmeas não gestantes permanecem não servidas (Sá Filho et al., 2014).

3.2 Sincronização de estro e ovulação

Em programas de biotecnologias reprodutivas com uso da IA, a detecção do estro por meio de observação tornou-se um dos principais desafios no emprego da técnica (Lopez et al., 2004). Essa limitação motivou que estudos relacionados ao controle do ciclo estral da vaca fossem desenvolvidos com intuito de buscar maior praticidade na técnica. Com o advento da ultrassonografia e com a possibilidade de conhecer a dinâmica das ondas foliculares, a então ideia de controlar o ciclo estral das vacas tornou-se mais próxima do real.

Os programas hormonais de sincronização são ferramentas que possibilitam a utilização da IA com a finalidade de concentrar a mão-de-obra utilizada na propriedade, de sincronizar e de induzir a ciclicidade dos animais, de diminuir os efeitos ambientais e da amamentação, e consequentemente, melhorarem as taxas de prenhez (Neves et al, 2010).

Existem diversas formas possíveis para controlar o desenvolvimento folicular em bovinos. O surgimento de novas ondas foliculares tem sido influenciado por procedimentos mecânicos ou por tratamentos hormonais (Baruselliet al., 2002).

Nos dias de hoje, é possível ter um controle sobre o ciclo estral da vaca de forma eficiente, o que nos permite sincronizar o crescimento folicular e induzir a ovulação de um folículo dominante em um momento conhecido, permitindo a inseminação em um dia pré-determinado sem necessidade de observar o cio

(Baruselliet al, 2004). A sincronização pode ser empregada em vacas de qualquer idade, independentemente de estarem cíclicas ou em anestro (Bóet al, 2003).

A combinação de progesterona e benzoato de estradiol é um dos mais comuns protocolos de sincronização, que tem por objetivo promover a atresia do folículo dominante e o recrutamento de uma nova onda folicular 4 dias após administração destes hormônios. Entretanto o estado do ovário no início do protocolo de sincronização pode ser fator variável para os resultados finais. Há dados mostrando que protocolos de sincronização da ovulação (IATF) são mais eficientes quando iniciados em fases determinadas do ciclo estral (Vasconcelos et al, 1999;. Moreira et al., 2000).

O controle exógeno do desenvolvimento folicular e lúteo facilita a aplicação de tecnologias de reprodução assistida em bovinos, oferecendo a possibilidade de planejar a superestimulação das doadoras e a sincronização de receptoras em um tempo fixo, sem a necessidade de detecção de estro e sem resultados insatisfatórios (Bóet al., 2002).

Os tratamentos mais utilizados para a sincronização de receptoras consistiam na administração de duas doses de PGF2 α com intervalos de 11 a 14 dias. Com isso, se todas as receptoras estiverem ciclando, em torno de 80% delas apresentariam sinais de estro 5 dias após o tratamento. Entretanto, devido à baixa acurácia na detecção do estro, apenas 50% das receptoras tratadas serão detectadas em cio, apresentarão CL e receberão um embrião sete dias após o estro. Porém se viu que a incorporação de técnicas para o controle da dinâmica das ondas foliculares reduziria a variabilidade ao tratamento de doadoras em diferentes estágios do ciclo estral, notando-se que esquemas de sincronização de estro baseados tanto no controle luteínico quanto no controle folicular do ciclo estral permitem a IA em tempo fixo e eliminam a necessidade de detecção de estro em receptoras (Bóet al, 2004).

O estradiol e a progesterona são amplamente utilizados para protocolos de superestimulação com produção de embriões equivalente ao de vacas doadoras

superovuladas, empregando-se a tradicional abordagem com início de oito a doze dias após o estro. Estas possuem como resultados taxas de prenhez comparáveis àquelas obtidas com embriões transferidos sete dias após a observação do estro (Bó et al., 2002).

Apesar de a variabilidade na resposta ter continuado a ser um dos problemas mais frustrantes associados com sincronização de estro e com programas de superovulação em bovinos (Baruselliet al., 2002), o estradiol e a progesterona combinados com PGF2 α e eCG (dado 1 dia depois da hora prevista de emergência da onda) resultaram em altas taxas de ovócitos selecionados para a transferência (84,6%) e uma prenhez de 48,7% (Bó et al., 2002).

Dentre os hormônios utilizados no tratamento hormonal em vacas no pós-parto, estão os progestágenos, os derivados do 17- β estradiol, o eCG, o FSH, a PGF2 α , e o GnRH. As associações feitas com esses hormônios visam aumentar a fertilidade do estro induzindo com precisão o momento da ovulação quando a IATF ou a TETF é utilizada (Neves et al, 2010).

3.2.1 Progesterona e progestágenos

Os progestágenos são de grande importância, visto que diminuem a ocorrência de ciclos curtos após a primeira ovulação e ajudam a restabelecer a ciclicidade (Perry et al., 2004; Sá Filho et al., 2009a,b). Os ciclos curtos devidos à luteólise prematura são decorrentes de uma liberação precoce de PGF2 α por um número insuficiente de receptores de progesterona no endométrio (Zollers et al., 1993).

Quando os progestágenos são administrados de forma contínua, entre cinco e nove dias, inibem a secreção de LH. A partir do momento em que a exposição a esse hormônio é interrompida, ocorre uma onda de LH capaz de induzir o crescimento do folículo pré-ovulatório, culminando com a ovulação. Contudo a utilização desses progestágenos de forma indevida pode levar à formação de folículos persistentes. A partir dessa dominância persistente, o

desenvolvimento dos folículos torna-se desorganizado e quase sempre seus ovócitos são inférteis (Fortune & Rivera, 1999).

Como resultado dos inúmeros aspectos positivos da utilização de progestinas, pesquisas consideráveis têm sido realizadas para desenvolver tecnologias que reúnam as vantagens proporcionadas pela progesterona, evitando-se ao mesmo tempo os aspectos negativos do crescimento folicular alterado (Burke, 2003).

A progesterona tem papel determinante no desenvolvimento embrionário, pois a concentração circulante deste hormônio durante o período de reconhecimento materno da gestação é correlacionada com a taxa de crescimento embrionário, com a produção de INT- τ e com a taxa de prenhez (Strongeet al., 2005; McNeill et al., 2006). Estudos já foram realizados na tentativa de aumentar as concentrações circulantes de progesterona a partir da inserção de implantes intra-vaginais em diferentes dias após inseminação (Mann et al., 2006; Carter et al., 2008; Beltman et al., 2009).

3.2.2 Estradiol

O estradiol é uma excelente ferramenta para induzir a atresia de folículos do ovário (Bo et al., 1995a e 1995b). Com a finalidade de evitar a persistência folicular, derivados do 17- β estradiol são utilizados em conjunto com os progestágenos na sincronização, pois levam à regressão do folículo dominante e promovem um novo recrutamento folicular, caracterizando uma nova onda folicular com grande potencial de fertilidade (Bó et al., 2000).

Os derivados do 17 β – estradiol utilizados com maior frequência são o benzoato de estradiol (BE) e o cipionato do estradiol (CE). Esses hormônios levam à regressão de folículos LH-dependentes por sua interação com a P4 e FSH dependentes por si só (Martinez et al., 2005), promovendo uma nova onda folicular após 4 e/ou 3 dias de sua aplicação (Bó et al., 2000). Porém, ambos são diferentes quanto a sua utilização, pois possuem meias-vidas distintas. O

Benzoato de Estradiol é sabidamente uma preparação farmacológica de tempo de meia-vida mais curto que o Cipionato de Estradiol. Isso significa que o benzoato de estradiol tem um tempo de atuação mais pontual, fazendo com que sua atuação seja mais sincrônica que o cipionato (Andrade et al. 2012).

Vários trabalhos demonstram que a utilização de BE ou de CE mostra-se eficiente quando estes são empregados como indutores de ovulação, com semelhanças em relação à dinâmica folicular.

A escolha do cipionato de estradiol em substituição ao benzoato de estradiol não compromete os índices de concepção dos animais inseminados 48h (manhã) ou 54h (tarde) após a remoção da progesterona, no entanto sua escolha torna a execução dos protocolos mais simplificada, proporcionando uma redução no número de manejo do protocolo e, conseqüentemente, um menor custo logístico e operacional. Essa extensão no intervalo para a realização das inseminações (manhã e tarde) revela-se como uma alternativa aos modelos de gestão no uso dessa biotecnologia, permitindo a inclusão de um maior número de animais submetidos a um protocolo e inseminados no mesmo dia (Andrade et al. 2012). Vale ressaltar que a escolha do protocolo a seguir deve ser realizada de acordo com características pertinentes de cada propriedade.

Contudo, a aplicação do estradiol para sistemas de controle de estro se estende para além da capacidade de regular o processo da dinâmica folicular. O estradiol também pode ser utilizado para sincronizar os eventos de estro e da ovulação após a retirada da progestina. Para qualquer indicação, os efeitos de estradiol são mediados através do eixo gonadotrópico, com a presença ou com a ausência de progesterona para a determinação do tipo de resposta eliciada pelo estradiol (Burke, 2003).

Em um estudo, foi comparada a eficácia do BE, em doses de 0,5, 1 ou 2 mg / 500 kg de peso corporal para induzir a regressão da onda folicular em vacas. Como resultado, tanto 1 e como 2 mg de BE foram altamente eficazes (Bogacz et al., 2000).

A capacidade do estradiol para induzir nova onda folicular é dependente das concentrações de progesterona em circulação. Isso foi claramente demonstrado em vacas que receberam uma injeção de 1 mg de BE no dia 13 do ciclo estral e depois receberam tratamento adicional, de uma dose luteolítico de PGF2 α quer 0, 24 ou 48 h após a injeção de benzoato de estradiol (Burke et al., 1997).

3.2.3 Gonadotrofinas

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é produzida pelos cálices endometriais das éguas entre os dias 40-120 de gestação. Sua função primordial é estimular a manutenção do corpo lúteo primário e promover uma luteinização dos folículos secundários, formando, assim, corpos lúteos acessórios que ajudam a elevar a concentração de P4 até que a placenta seja a fonte principal da produção deste hormônio (Senger, 2003). Quando aplicado em fêmeas bovinas, possui ação nos receptores LH e FSH, estimulando a esteroidogênese e o crescimento folicular (Duffy et al., 2004; Senger, 2003).

Quando o eCG é aplicado antes da retirada dos progestágenos e em doses baixas, o folículo dominante adquire maiores dimensões após a suspensão do tratamento com progestágenos (Loguércio, 2005). Seu uso é necessário para animais com baixa condição corporal (CC <3), provavelmente devido à alta frequência de anestro encontrada nesta categoria (Baruselliet al., 2004b). Contudo algumas pesquisas recentes estudam a possibilidade da substituição do eCG por uma única aplicação de FSH (Nascimento et al., 2007a,b; Santos et al., 2007a,b; Valentin et al., 2008).

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma glicoproteína secretada pela adeno-hipófise. No folículo, o FSH age em sinergismos com o estradiol para aumentar o número de receptores nas células da granulosa, onde desempenha papel na formação do antro e estimula a proliferação celular na granulosa (Ayres, 2011).

O FSH é responsável pelo estímulo da produção de estradiol pelos folículos ovarianos, pois a elevação das concentrações de FSH desencadeia o aumento da conversão de andrógenos em estrógeno por meio do aumento da atividade da enzima aromatase (Spinosa et al., 2006). Sua ação pode sofrer variação de acordo com alguns fatores como pureza do hormônio, quantidade de gonadotrofina administrada, via e local de administração, quantidade de gordura subcutânea (Gonzales et al., 1990; Bo et al., 1994).

3.2.4 Prostaglandinas e análogos

Prostaglandinas, com suas diversas funções, são sinais químicos celulares lipídicos similares a hormônios, porém que não entram na corrente sanguínea, atuando apenas na própria célula e nas células vizinhas. Sua secreção no endométrio é regulada pelo estrógeno e pela progesterona (Spinosa et al., 2006).

A sincronização do estro, por meio da aplicação de agentes luteolíticos, como a prostaglandina (PGF_{2a}), ou seus análogos, tem sido amplamente utilizada, tanto em casos de monta natural, de inseminação artificial, como na técnica de transferência de embriões (TE), para a qual é imprescindível. Trata-se de um método prático e que induz um estro de fertilidade comparada ao natural (Fernandes, 1994).

Sabe-se que, além da presença de um corpo lúteo funcional, a eficiência do processo luteolítico varia de acordo com a fase do ciclo estral na qual a fêmea se encontra quando recebe o produto com esta finalidade (Spinosa et al., 2006).

A variação da sensibilidade do corpo lúteo aos análogos da prostaglandina depende do dia do ciclo. Do estro até cerca de seis dias após este evento, a sensibilidade à prostaglandina e seus análogos no corpo lúteo é mínima. Assim sendo, a resposta aos indutores de luteólise é irrisória. Entre seis e dez dias do ciclo estral, a literatura indica uma elevação gradativa da sensibilidade. Nessa fase, o corpo lúteo passa a ser sensível, além de apresentar resposta dependente da dose de produto utilizada para induzir a luteólise. A partir de doze dias após o

estro, a sensibilidade atinge seu limite e assim permanece até o período da luteólise natural (Spinosa et al., 2006).

3.2.5 Hormônio liberador de gonadotrofinas

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é um hormônio polipeptídico sintetizado pelo hipotálamo, que age sobre a hipófise e leva à liberação dos hormônios LH e FSH; como consequência, o GnRH é responsável por regular indiretamente a atividade gonadal por meio de estímulos da secreção de LH e FSH pela hipófise. A frequência e a amplitude dos pulsos de GnRH e gonadotrofinas são responsáveis pelo controle da atividade gonadal e, conseqüentemente, das funções reprodutivas (Spinosa et al., 2006).

A frequência e a amplitude dos pulsos de secreção de GnRH dependem de neuromodulações e podem variar de acordo com a maturação sexual e com a fase do ciclo reprodutivo (Spinosa et al., 2006).

3.2.6 Ressincronização

Rotineiramente, com o uso da IA convencional, após a observação de estro, são apontados dados de que em torno de 55% a 70% de vacas leiteiras não conseguem engravidar com a IA e devem ser reinseminadas (Santos et al., 2004).

Vários programas de sincronização têm sido aplicados em vacas leiteiras com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva diminuindo o intervalo de partos. No entanto, na maioria das vezes, as vacas precisam ser identificadas como não prenhes para depois sofrerem um programa de ressincronização (Sinedino et al., 2014), o que é realizado tradicionalmente em torno de 35 a 40 dias após a IA por palpação transretal para identificação da vesícula amniótica, ou com 27 dias após IA com o auxílio da ultrassonografia (Silva et al., 2007).

Em protocolos de IATF comum ou mesmo em programas de TE, a reinseminação ou reinovulação, respectivamente, só acontecem em torno de 35 dias após a primeira tentativa (Galvão et al., 2007). Com o objetivo de minimizar

esse intervalo entre a primeira e a segunda inseminação/inovulação, métodos de ressincronização precoce são empregados (Caraviello et al., 2006).

O diagnóstico de gestação precoce seguido de ressincronização já é uma ferramenta eficiente para otimizar o gerenciamento de uma propriedade, reduzindo o tempo até a gestação (Melendez et al., 2006), porém a atividade ainda exige menores intervalos para diminuir perdas, o que pode ser feito com a ressincronização premeditada ao diagnóstico de gestação.

Diferentes protocolos de ressincronização têm sido propostos para gado de leite (Cavalieri et al., 2007; Green et al., 2010) e corte (Colazo et al., 2006, Sa Filho et al., 2013). Todos, porém, visam à melhoria da eficiência de programadas de IA. Como os protocolos para IA e TE apresentam semelhanças, metodologias semelhantes poderiam ser utilizadas para receptoras de embrião.

A principal questão técnica dos protocolos de ressincronização, iniciados em fêmeas com situação de gestação desconhecida, ou seja, antes do diagnóstico de prenhez, diz respeito à aplicação de produtos em fêmeas no início da gestação (Galvão et al., 2007). Alguns protocolos que utilizam análogos do GnRH para sincronização vêm sendo propostos (Mendonça et al., 2012), pois estas substâncias têm pouco ou nenhum potencial de interferir na manutenção da gestação (Chebel et al., 2003). De acordo com Cavalieri et al. (2007), os protocolos que utilizam ésteres de estradiol para a sincronização da onda de desenvolvimento folicular merecem atenção especial. A literatura é controversa no sentido de indicar a segurança desse produto em fêmeas gestantes. Alguns estudos indicam que ésteres de estradiol, aplicados no meio do diestro (dias 13-14 pós ovulação), podem comprometer a capacidade do corpo lúteo em produzir progesterona (El-Zarkouny et al., 2004) e reduzir a taxa de gestação. Outros, porém (Sá Filho et al., 2013), não mostram qualquer efeito deletério. Devido às variações das doses e dos análogos do estradiol, não se permite muitas vezes comparar os resultados dos diferentes estudos.

Segundo Baruselliet al. (2012), esse tipo de protocolo, utilizando ésteres de estradiol, é o mais efetivo e utilizado em animais de genética zebuína ou mestiços, categoria comum como receptoras no Brasil.

Iniciar protocolos ovsynch antes ou após o diagnóstico de gestação é uma estratégia usada para sincronizar a ovulação para IATF em vacas leiteiras. Essa abordagem tem sido amplamente bem sucedida com benzoato de estradiol porque este garante a inseminação das vacas em um prazo razoável sem detectar estro (Giordano et al., 2015).

Contudo, o estradiol é conhecido por estimular a presença de receptores de ocitocina e por potencializar sua ação no útero, liberando prostaglandina e desencadeando a luteólise. Entretanto, segundo Sá filho et al. (2013) e Bó et al. (2002), é possível utilizar 1 mg de BE no dia 22 após a primeira IA, mesmo com estado de prenhez ainda não confirmado, para voltar a sincronizar novilhas e vacas sem efeitos prejudiciais em uma prenhez pré-estabelecida.

El-Zarkouny e Stevenson (2004) e Munro et al. (1985) relatam que a administração de BE no meio do ciclo estral, em algumas categorias de vacas, para ressincronização do estro, comprometeu a capacidade do CL em produzir progesterona e diminuiu a porcentagem de prenhez. ARAÚJO et al. (2009) afirmam que estrógenos exógenos são indutores de luteólise, podendo aumentar as perdas embrionárias em fêmeas que estejam prenhes.

Galvão et al. (2007) e Stevenson et al. (2003) sustentam que a administração de estrógeno no momento da remoção do implante de progesterona, no dia 20 ou 21 após a primeira IA, não tem efeitos negativos sobre qualquer prenhez pré-estabelecida. Isso deve estar relacionado com o mecanismo luteolítico o qual o estrógeno pode desencadear, por já estar estabilizado no início gestação (20 dias pós inseminação), com o reconhecimento materno da gestação (Araújo et al. 2009, Robinson et al. 2001 e Bazer et al. 2009).

Outro método para ressincronização de vacas antes do diagnóstico de gestação é a aplicação de GnRH sete dias antes do diagnóstico de gestação, e caso este seja negativo, completa-se o protocolo (Chebel et al., 2003). Porém, quando avaliado sua eficiência, a utilização de 1 mg de BE tem maior eficiência do que a utilização de GnRH na ressincronização (Sá filho et al, 2013).

Segundo Galvão et al. (2007), taxas de prenhez semelhantes entre D31 e D61 após a IA, entre programas de ressincronização, em que se tratou vacas leiteiras em lactação e com status de prenhez desconhecida, não houve efeito sobre a possível gestação quando utilizada inserção de progesterona, ECP e GnRH.

Em programas de IATF, Chenault et al. (2003) relatam que o uso do CIDR de 14 a 21 dias pós a inseminação melhora a sincronização do retorno ao estro e melhora a taxa de prenhez em vacas reinseminadas, pois há um aumento da sobrevivência embrionária quando se utilizam implantes de progesterona em protocolos de ressincronização (14 a 21 dias pós IA) (Chebel et al., 2006).

A alta concentração de progesterona antes da inseminação artificial melhora as taxas de prenhez devido à melhor sincronização da ovulação e produz embriões de melhor qualidade (Denicolet al., 2012; Galvão et al., 2004). Vacas submetidas a programa de ovysinch podem se beneficiar quanto à aplicação de progesterona, uma vez que o risco do alto metabolismo de progesterona e a insuficiência lútea podem suprimir a fertilidade em vacas de alta produção leiteira (Sangsrivong et al., 2002), visto que a função uterina é prejudicada por baixas concentrações de progesterona (Cerri et al., 2011). Em dois estudos feitos recentemente por Bisinotto et al. (2010) e Dewey et al. (2010), com progesterona complementar, houve um aumento de 7% a 10% na taxa de prenhez.

Curiosamente, a inserção de progesterona em vaca com status de prenhez desconhecida aumenta a taxa de concepção (Chebelet al., 2006). O efeito negativo da inserção intravaginal de progesterona está apenas relacionado a um quadro de vaginite e possível metrite ascendente, que pode levar a uma baixa taxa de gestação (Chenault et al., 2003), o que é pouco percebido na literatura.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, R.R., et al. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **BiolReprod.**, JournalList, v.81, n 2, p.426–437, mar.2009.

ANDRADE, B.H.A. et al. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **ArchivesofVeterinary Science**, Universidade Federal da Bahia, v.17, n 4, p.70-82, ago.2012.

AYRES, H. **O uso de FSH exógeno estimula o crescimento folicular e a função luteínica de vaca holandesas em lactação sincronizadas para inseminação artificial em tempo fixo?** 2011. 114 fls. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2011.

BARUSELLI, P.S. et al. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction.**, Universidade Federal Fluminense, v.9, n 3, p.139-152, jun.2012.

BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., CARVALHO, N.A.T., MADUREIRA, E.H., CAMPOS FILHO, E.P. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, São Paulo, v.26, p.218-21, 2002.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **AnimReprodSci.**, São Paulo, v.82-83, p.479-86, ago.2004.

BAZER, F.W. et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Mol Human Reprod.**, Texas, v.16, n 3, p.135-152, out.2009.

BELTMAN, M.E. et al. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, Dublin, v.71 ,n 7, p.1173-1179, abr.2009.

BISINOTTO, R. S. et al. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for re-synchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **J. Dairy Sci.**, v.93, n 12, p.5798-5808, dez.2010.

BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, Córdoba, v.43, n 1, p. 31-40, jan.1995.

BÓ, G.A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17P treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, Saskatoon, v. 41, n 8, p.1555-1569, jun.1994.

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **AnimReprodSci.**, Córdoba, v.78, n 3-4, p.307-326, out.2003.

BÓ, G.A. et al. R. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, Saskatoon, v.57, n 1, p.53-72, jan.2002.

BÓ, G.A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen ear implants. **AnimReprod Sci.**, Saskatoon, v.59, n 3-4, p.141-157, maio2000.

BÓ, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Saskatoon, v. 39, n. 3, p. 193-204, fev.1995.

BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Córdoba, v.32, p.1-22, 2004.

BÓ, G.A.et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**,Córdoba,v.39, n 3,p.193–204,ago.2005.

BOGACZ, U.L.et al. Effect of estradiol benzoate in combination bwith progesterone to induce follicular turnover as various stages of the estrous cycle. **J. Anim. Sci.**,v. 78,p.211, 2000.

BURKE, C.R.et al. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**,New Zealand,v. 60, n 4, p.647–658, set.2003.

BURKER, C.R. et al. Effect of luteolysis on follicle wave control using oestradiol benzoate in cattle.**Proc. N.Z. oc. Endrocino**, New Zealandv.40, p.134, 1997.

CARAVIELLO, D. Z.et al. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. **J. Dairy Sci.**, Madison,v. 89, n 12,p.4723-4735, maio2006.

CARTER, F., FORDE, N., DUFFY, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.**Reproduction, Fertility and Development**,Dublin ,v.20, n 3,p.368 – 375, fev.2008.

CAVALIERI, J.et al. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device for 7 or 8d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24h after removal. **Theriogenology**, Werribee,v.67,n 4,p.824–834,mar.2007.

CERRI, R.L.A.et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **J Dairy Sci.**, Vancouver, v. 94, n 7, p. 3352-3365, jul.2011.

CHEBEL, R. C.et al. Reproduction in dairy cows following progester-one insert presynchronization and resynchronization protocols. **J. Dairy Sci.**, Tulare, v.89, n 11, p.4205-4219, nov.2006.

CHEBEL, R. C.et al. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Tulare, v.60, n 8, p.1389-1399, nov.2003.

CHENAULT, J.R. et al. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. **J DairySci.**, Kalamazoo, v.86, n 6, p.2039-2049, jun.2003.

COLAZO, M.G.et al. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. **Theriogenology**, Saskatoon, v.65, n 3, p.557-572, fev.2006.

DENICOL, A.C. et al. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. **J Dairy Sci.**, Gainesville, v.95, n 4, p.1794-1806, abr. 2012.

DEWEY, S. T., et al. Resynchronization strategies to improve fertility in lactating dairy cows utilizing a presynchro-nization injection of GnRH or supplemental progesterone: I. Preg- nancy rates and ovarian responses. **J. Dairy Sci.**, São Paulo, v.93, n 9, p. 4086-4095, set.2010.

DUFFY, P., CROWE, M.A., AUSTIN, E.J. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, Dublin, v.61, n 4, p.725-734, fev.2004.

EL-ZARKOUNY, S. Z., STEVENSON, J. S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of un-known pregnancy status. **J. Dairy Sci.**,Manhattan, v.87, n 10, p.3306-3321, out.2004.

EL-ZARKOUNY, S.Z. et al. Pregnancy in Dairy Cows After Synchronized Ovulation Regimens With or Without Presynchronization and Progesterone. **J. DairySci.**,Manhattan,v.87,n 4, p.1024–1037,abr.2004.

FERNANDES, C.A.C., VELASQUEZ, L.F.U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação em receptoras de embrião. **Archivos de Reproduccion Animal**, Botucatu,v.1,p.28-31, 1997.

FERNANDES, C.A.C., TORRES, C.A.A., COSTA, E.P. Comparação entre doses e vias de aplicação de cloprostenol para sincronização de estro em bovinos. **Rev. Bras. de Reprod. Animal.**,, v.18, n.34, p.105-109,1994.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M. Folículo dominante persistente em bovinos: aspectos básicos e aplicados. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, p.22-34, 1999.

FRARE, A. L., etal.**Fatores de insucesso da FIV**.Cascavel : Faculdade Assis Gurgacz,2013.

GALVÃO, K.N.et al. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status.**J DairySci.**,Tulare,v.90,n 9, p.4240–4952, set.2007.

GALVÃO, K.N. et al. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **J AnimSci.**,Tulare, v.82, n 12, p.3508-3517, dez.2004.

GIORDANO, C. et al. The phenotypic expression of mitochondrial tRNA mutations can be modulated by either mitochondrial leucyl-tRNA synthetase or the C terminal domain thereof. *Front Genet. Journal Article*, Rome, v.6, p.113, mar.2015.

GONZALEZ, A.M., et al. Mitochondrial DNA evolution in the obscure species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol.*, v.31, n 2, p.122-131, ago.1990.

GREEN, J. C. et al. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20 d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod.Sci.*, Thomasville, v.121, n 1-2, p.24-33, ago.2010.

GREEN, J. C., NEWSOM, E. M., LUCY, M. C. Incorporation of a rapid pregnancy-associated glycoprotein ELISA into a CIDR- Ovsynch resynchronization program for a 28 day re-insemination interval. *Theriogenology*, Thomasville, v.75, n2, p.320-328, jan.2011.

LOGUÉRCIO, R.S. **Regulação de receptores esteróides e dinâmica folicular em um sistema de indução hormonal pós-parto em vacas de corte.** 2005. 80 fls. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

LOPEZ, H., SATTER, L. D., WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod.Sci.*, Madison v.81, n 3-4, p.209-223, abr.2004.

LOPEZ-GATIUS, F. et al. Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. *Theriogenology*, Lleida, v.62, n 8, p.1529-1535, nov.2004.

MANN, G.E., FRAY, M.D., LAMMING, G.E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet J.*, Nottingham, v.171, n 3, p.500-503, maio 2006.

MARTÍNEZ, M.F. et al. Effects of estradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **AnimReprod Sci.**, Saskatoon, v.86, n 1-2, p.37-52, mar.2005.

MCNEILL, R.E., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, Athenry, v.65, n 7, p.1435-1441, abr.2006.

MELENDEZ, P. et al. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. **J DairySci.**, Gainesville, v.89, n 12, p.4567-4572, dez.2006.

MENDONÇA, L. G. D. et al. Effects of resynchronization strategies for lactating Holstein cows on pattern of reinsemination, fertility, and economic outcome. **Theriogenology**, Minnesota, v.77, n 6, p.1151-1158, abr.2012.

MOREIRA, F. et al. .Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **J. Anim. Sci.**, Gainesville, v.78, n 6, p.1568-1576, jun.2000.

MUNRO, R.K., MOORE, N.W. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. **J ReprodFertil**, Sydney, v.73, n 2, p.353–359, mar.1985.

NASCIMENTO, V.A.; TORRES, C.A.A.; DIAS, M. Dinâmica folicular na sincronização de ovulação associado à administração de FSH-p em vacas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007b, Salvador. **Anais...** Salvador :SBTE, 2007b, p.1134.

NASCIMENTO, V.A., TORRES, C.A.A., DIAS, M. Taxas de prenhez com o uso do FSH-p na sincronização da ovulação em vacas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007, Salvador. **Anais...** Salvador :SBTE, 2007a. 1135 p.

NEVES, J.P., MIRANDA, K.L., TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v.39, p.414-421, 2010.

PERRY, G.A., SMITH, M.F., GEARY, T.W. Ability of intravaginal progesterone inserts and melengestrol acetate to induce estrous cycle in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, Missouri, v.82, n 3, p.695-704, mar.2004.

ROBINSON, R.et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, Potters Bar, v.122, n 6, p.965-979, dez.2001.

SÁ FILHO, O.G.et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, Botucatu, v.72, n 2, p.210-218, Jul. 2009a.

SÁ FILHO, M.F.et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, São Paulo, v.81, n 2, p.284-290, jan.2013.

SÁ FILHO, M.F.et al. Biotécnicas da reprodução para melhorar a fertilidade da vaca leiteira. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2014, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre :Gráfica Ufrgs, 2014.p.152-188.

SÁ FILHO, O.G.; THATCHER, W.W.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrus Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, Botucatu, v.112, n 1-2, p.95- 106, maio2009b.

SALES, J.N., CARVALHO, J.B., CREPALDI, G.A., CIPRIANO, R.S., JACOMINI, J.O., MAIO, J.R.G. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, São Paulo, v.78, n3, p.510–516, ago.2012.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17b in dairy cattle. **J Dairy Sci.**, Madison, v.85, n 11, p.2831-2842, nov.2002.

SANTOS, I.C.C.; MARTINS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo da dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro sincronizadas com protocolo IATF, utilizando Folltropin (FSH- p) como indutor de crescimento folicular. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007a Salvador. **Anais...** Salvador :SBTE, 2007a.p. 1152.

SANTOS, I.C.C., MARTINS, C.M., VALENTIN, R. Taxa de prenhez a IATF de vacas zebuínas em anestro tratadas com dose única de FSHp (Folltropin®). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007b, Salvador. **Anais...** Salvador : SBTE, 2007b.p. 1151.

SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim. Reprod. Sci.**, Tulare, v.82, n 2p.513-535, jul.2004.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. Washington: Current Conceptions, 2003.314 p.

SILVA, E. et al. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. **J. Dairy Sci.**, Madison, v.90, n 10, p.4612-4622, out. 2007.

SINEDINO, L.D. et al. Effect of early or late resynchronization based on different methods of pregnancy diagnosis on reproductive performance of dairy cows. **J DairySci.**, Gainesville, v.97, n 8, p.4932-4941, ago.2014.

SPINOSA, H. S., GORNIK, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2006.

STEVENSON, J.S. et al. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. **J Anim Sci.**, Alexandria, v.81, n 7, p.1681-1692, jul. 2003a.

STEVENSON, J.S.; JOHNSON, S.K.; MILLIKEN, G.A. Symposium Paper: Incidence of postpartum anestrus in suckled beef cattle: Treatments to induce estrus, ovulation, and conception. **Prof Anim Sci.**, Manhattan, v.19, n 2, p.124-134, abr.2003b.

STRONGE, A.J.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. Post- insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, Atehnry, v.64, n 5, p.1212-1224, set.2005.

VALENTIN, R., MARQUES, M.O., CREPALDI, G.A. Efeito do tratamento com FSH na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona sobre a taxa de prenhez de primíparas Nelore inseminadas em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Anais...** Guarujá :SBTE, 2008.p.597.

VASCONCELOS, J.L.M., et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Botucatu, v.52, n6, p.1067-1078, ago.1999.

VIANA, J. H. M. et al. Use of in vitro fertilization Technique in the least decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientia Veterinariae**, Juiz de Fora, v.38, n 2, p.661-674, jul.2010.

WARNICK, L. D. et al. The relationship of the interval from breeding to uterine palpation for pregnancy diagnosis with calving outcomes in Holstein cows. **Theriogenology**, Blacksburg, v.44, n 6, p.811-825, out.1995.

ZOLLERS, W.G., GARVERICK, H.A., SMITH M.F. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. **Reproduction**, Missouri, v.97, n2, p.329-337, mar.1993.

4 CAPÍTULO 2. Manuscrito a ser enviado à revista: Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESSINCRONIZAÇÃO COMO FERRAMENTA PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA
DA UTILIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS

Reshynchronization as a toll to improve the efficiency of bovine embryo transfer
recipients utilization

Raymundy, A.S.¹; Garcia, J.A.D.²; Fernandes, C.A.C.²

¹ – Mestrando Unifenas – Rod. MG 179, km 0, Alfenas, MG Brasil,
aecio_4_5@yahoo.com.br; ² - Prof. Unifenas.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um protocolo de ressinchronização na taxa de prenhez em novilhas mestiças utilizadas como receptoras de embrião. Este experimento foi desenvolvido em uma fazenda localizada no sudoeste de Minas Gerais. Foi composto de duas etapas: **Experimento 1:** Visou avaliar a eficiência de 1mg de benzoato de estradiol (BE) na sincronização da onda de desenvolvimento folicular. Foram utilizadas 40 fêmeas mestiças divididas em dois grupos. **G1** - 1mg de BE; e **G2** - 1 ml de soro fisiológico. As alterações da dinâmica folicular foram acompanhadas por ultrassonografia. A Aplicação de 1mg de BE se mostrou eficiente (95%) na sincronização do desenvolvimento folicular. No **experimento 2**, foram produzidos 275 embriões in vitro (PIV), utilizando doadoras Gir (*Bostaurusindicus*) e sêmen sexado da raça holandês. A transferência de embriões foi sincronizada por meio de um protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF): D0: dispositivo intravaginal de progesterona- DIP (Prociclar - Brasil) mais 0,5 mg de benzoato de estradiol - BE IM; D8: remover DIP mais 0,5 mg de cipionato de estradiol - CE IM e 0,15mg de D-Cloprostenol.No dia da transferência de embriões (D17), as receptoras foram avaliadas por ultrassom (Mindray - M5). Catorze dias após a transferência de embriões (TE), as receptoras foram divididas aleatoriamente

em dois grupos: G1 (n = 137) início do protocolo ressincronização com a inserção de um DIP e aplicação de 1 mg de BE, e G2 (n = 138) não foi tratada. Esse procedimento foi desenvolvido para avaliar o efeito da aplicação de estradiol no início da prenhez. Oito dias mais tarde, todas as receptoras foram novamente avaliadas por ultrassom para diagnóstico de gestação. Nas fêmeas gestantes do G1, só foi removido o DIP. As fêmeas não gestantes nesse grupo receberam 0,5 mg de CE e 0,15 mg de D-Cloprostenol IM e DIP foi removido. Dez dias depois, foram novamente avaliadas e aquelas capazes foram inovuladas. No G2, o início do segundo protocolo TETF só começa depois do diagnóstico de não prenhe. Foi comparada por χ^2 a taxa de prenhez após a primeira e a segunda transferência de embriões e o número de receptoras grávidas aos 30 e 45 dias. A taxa de prenhez após a primeira TE não teve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ – 49,6% vs 48,6% para G1 e G2, respectivamente). Esse resultado confirma que a inserção de um DIP e a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol em vacas no início da prenhez não interfere na manutenção da gestação. Também não houve diferença na taxa de prenhez após a segunda TE ($P > 0,05$ – 47,8% vs 45,1% para G1 e G2, respectivamente). Conclui-se que o protocolo de ressincronização utilizado não interfere na manutenção da gestação precoce em receptoras e pode antecipar a gestação, permitindo que receptoras emprenhem num curto período de tempo.

Palavras Chave: Hormônios, fertilização in vitro, taxa de gestação.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of a resynchronization protocol, in the rate of pregnancy in mixed breed cattle; used as embryo recipients.

This study was conducted on a farm in the southeastern part of Minas Gerais – Brazil, and it was divided into two experiments: Experiment 1: It had the purpose of evaluating the efficiency of the administration of - 1mg estradiol benzoate (BE) on the synchronization of cycle waves and follicular development.

Therefore, 40 mixed breed cows were divided into two groups; G1 – received 1mg of estradiol benzoate; While G2 – received 1ml of physiologic serum. The follicular development was observed through ultrasound imaging, proved to be efficient in (95%) of the synchronization and follicular and development. Experiment 2: 275 in vitro embryos (PIV) were developed using Gir (*Bos Tauros Inducus*) oocytes and Holstains cattle sexed semen. The embryo transfers were synchronized through a protocol of embryo transfer in fixed time (TETF). Day 0: insertion of progesterone implants DIP (Prociclar – Brazil), added to 0,5mg Estradiol Benzoate (BE) IM; Day 8 – Removal of DIP implants and administration of 0,5mg of Estradiol Cypionate CE (IM) and 0,15mg of D Cloprostenol on the day of the embryo transfers (D17) – All recipient animals were examined through ultrasound (Midday – M5). Fourteen days after the embryo transfer (TE) the animals were randomly divided in two groups: G1 (n 137) began the protocol of resynchronization with the insertion of the DIP implants and the application of 1mg Estradiol Benzoate (BE), and the animals from G2 (n 138) were not treated. This procedure was developed to evaluate the effects of the application of estradiol in the beginning of the pregnancy. Eight days later, all recipients were once again evaluated through ultrasound for diagnose of pregnancy. On the pregnant recipients of G1 only the DIP implants were removed, while the non pregnant recipients received 0,5mg of CE, and 0,15mg D-Cloprostenol IM and the implant (DIP) was also removed. Ten days later these animals were evaluated again, and those found capable were unovulated. On G2 was established a second TETF protocol beginning just after the confirmation of non pregnancy. It was compared to χ^2 the rate of pregnancy after first and second embryo transfers and the number of pregnant recipients on 30 and 45 days. The rate of pregnancy after the first embryo transfer (TE) presented no difference between the groups ($p > 0,05$ – 47,8% vs 45,1% for G1 and G2 respectively). Therefore we can conclude that the protocol of resynchronization does not interfere in the maintenance of early pregnancy in recipients and can anticipate a pregnancy, allowing the recipients to become pregnant in a short period of time.

Key words: Hormones, In Vitro fertilization, pregnancy rate.

INTRODUÇÃO

Em um programa de multiplicação genética de bovinos por embriões, os custos de manutenção de receptoras estão entre os principais, além de que a oferta destes animais em quantidade e qualidade é um dos principais fatores limitantes à disseminação da PIVE (Viana et al., 2010). Alternativas têm sido observadas, principalmente em rebanhos leiteiros, para minimizar esses impactos econômicos e aumentar a disponibilidade de receptoras de embrião. No Brasil, cada vez mais, utiliza-se como receptoras fêmeas com baixo mérito genético, pertencentes ao próprio rebanho leiteiro em que o programa de TE é desenvolvido. Dessa forma, aumenta a importância do desempenho reprodutivo, visto que as fêmeas utilizadas como receptoras têm a função de manter a produção de leite da propriedade.

Diante desse cenário, a eficiência reprodutiva das receptoras ficou ainda mais importante. Para evitar perdas, alternativas têm sido propostas, visando ao uso racional das fêmeas que recebem os embriões. Os protocolos de ressincronização, embora em baixa escala, já utilizados para aumentar a taxa de animais servidos em programas de inseminação artificial (IA), podem ser também aplicados quando as fêmeas são servidas com embriões em um programa de TE. Na ressincronização, o novo protocolo é iniciado mesmo antes do diagnóstico de gestação, visando à redução no tempo em que as fêmeas não gestantes permanecem não servidas (Sá Filho et al., 2014).

Vários programas de sincronização têm sido aplicados em vacas leiteiras com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva, diminuindo o intervalo de partos. No entanto, na maioria das vezes, as vacas precisam ser identificadas como não prenhes para depois sofrer um programa de ressincronização (Sinedino et al., 2014), o que é realizado tradicionalmente em torno de 35 a 40 dias

após a IA por palpação transretal para a identificação da vesícula amniótica, ou com 27 dias após IA com o auxílio da ultrassonografia (Silva et al., 2007).

Em protocolos comuns, a reutilização dos animais só acontece em torno de 35 dias após a primeira tentativa (Galvão et al., 2007). Na pretensão de minimizar esse intervalo entre a primeira e a segunda inseminação/inovulação, métodos de ressincronização precoce são empregados (Caraviello et al., 2006).

A principal questão técnica dos protocolos de ressincronização, iniciados em fêmeas com situação de gestação desconhecida, ou seja, antes do diagnóstico de prenhez, diz respeito à aplicação de produtos em fêmeas no início da gestação (Galvão et al., 2007). Alguns protocolos que utilizam análogos do GnRH para sincronização têm sido propostos, pois essas substâncias possuem pouco ou nenhum potencial de interferir na manutenção da gestação (Chebel et al., 2003). De acordo com Cavalieri et al. (2007), os protocolos que utilizam ésteres de estradiol para sincronização da onda de desenvolvimento folicular merecem atenção especial.

A literatura é controversa no sentido de indicar a segurança desse produto em fêmeas gestantes. Alguns estudos indicam que ésteres de estradiol, aplicados no meio do diestro (dias 13-14 pós ovulação), podem comprometer a capacidade do corpo lúteo em produzir progesterona (El-Zarkouny et al., 2004) e reduzir a taxa de gestação. Outros, porém (Sá Filho et al., 2013), não mostram qualquer efeito deletério. Devido às variações das doses e dos análogos do estradiol, não se permite muitas vezes comparar os resultados dos diferentes estudos.

Os objetivos deste estudo são inicialmente verificar a eficiência de uma dose reduzida de benzoato de estradiol, na sincronização da onda de desenvolvimento folicular em fêmeas mestiças. Em uma segunda etapa, verificar se esse produto é seguro para a utilização num protocolo de ressincronização em receptoras de embrião com situação de gestação desconhecida e também a eficiência desse protocolo em antecipar a gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em dois experimentos. Inicialmente, na primeira etapa, (exp. 1) procurou-se determinar a eficiência de utilização de 1mg de benzoato de estradiol (BE) para a sincronização da onda de desenvolvimento folicular. Na segunda etapa (exp. 2), foi avaliado o efeito de um protocolo de ressincronização, em fêmeas com situação de gestação desconhecida, ou seja, iniciado antes do diagnóstico de gestação em receptoras de embrião. Em ambos os experimentos, utilizaram-se fêmeas bovinas mestiças, sem raça definida, manejadas em pastagem de *Brachiária* *brizanta*, suplementadas com mistura mineral comercial e água ad libitum.

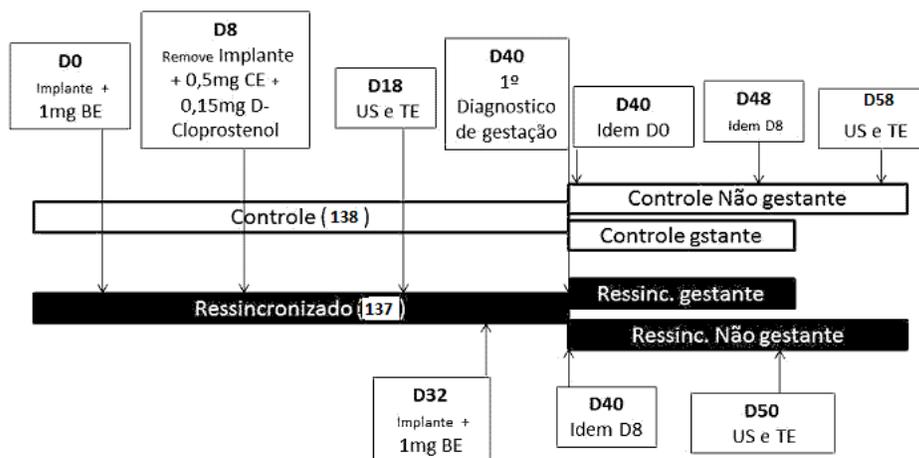
Experimento 1: Neste experimento, foram utilizadas 40 fêmeas, previamente sincronizadas, sendo 20 vacas e 20 novilhas. Somente foram utilizadas fêmeas ciclando, caracterizadas pela presença de um corpo lúteo. Os animais tiveram o diâmetro do maior folículo mensurado por ultrassonografia no início do estudo, quando foram divididas de acordo com essa mensuração em dois grupos homogêneos. BE (N=20) receberam implante de progesterona e 1mg de benzoato de estradiol Intramuscular, e SF (N=20) implante de progesterona e 1mL de soro fisiológico. Para avaliar a ocorrência de atresia, o diâmetro do maior folículo foi novamente mensurado nos dias 2 e 3 após os tratamentos. Outras avaliações ultrassonográficas foram feitas nos dias 4 e 5, visando detectar a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular. Considerou-se a onda sincronizada quando houve redução do diâmetro do folículo dominante entre D0 e D3 e a presença de um folículo com diâmetro superior a 4mm em desenvolvimento entre D4 e D5. Todas as avaliações foram realizadas com um equipamento de ultrassonografia portátil e transdutor linear transretal de 5,0MHz (Mindray™ – M5).

Experimento 2: Foram utilizadas 396 fêmeas mestiças, cíclicas, que tiveram a ovulação sincronizada pelo seguinte protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF): D0 – colocação de implante vaginal de progesterona e aplicação de 1mg de BE; D8 – retirada do implante, aplicação de

0,15mg de D-cloprostenol e 0,5mg de Cipionato de estradiol. Em D18, os animais foram avaliados por ultrassonografia e aqueles com corpo lúteo (Fernandes e Velasquez, 1997) foram inovulados com embriões produzidos in vitro (PIVE), originados de doadoras da raça Gir e sêmen sexado de touros da raça holandeses (HPB). Das fêmeas inicialmente preparadas, 275 receberam embriões em D18. Em D32, essas receptoras foram aleatoriamente divididas em dois grupos: RES (N=137), e receberam outro implante vaginal de progesterona e aplicação de 1mg de BE. O grupo CONT (N=138) que não receberam nenhum tratamento. Todas as fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação em D40. Nesse dia, as fêmeas do grupo RES que foram diagnosticadas gestantes tiveram o implante removido. Aquelas diagnosticadas não gestantes, além do implante retirado, receberam aplicação de 0,15mg de D-cloprostenol e 0,5mg de Cipionato de estradiol. Estas foram reavaliadas em D50, por meio da ultrassonografia, e aquelas com corpo lúteo foram novamente inovuladas nessa data.

Nas receptoras do grupo CONT com diagnóstico não gestante, iniciou-se em D40 um novo protocolo de TETF, exatamente como o anterior, e aquelas com corpo lúteo 18 dias após o final do protocolo (D58) foram novamente inovuladas. O esquema de tratamento de ambos os grupos está na Figura 1.

Figura 1: Esquema de tratamento dos animais nos diferentes grupos.



Após 22 dias da 2ª inovulação, foi realizado o diagnóstico de gestação por meio da ultrassonografia, para ambos os grupos.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC). Os dados referentes à atresia folicular no experimento 1 foram avaliados quanto à normalidade e aqueles com esta característica foram comparados por Anova. A eficiência na sincronização do desenvolvimento folicular foi comparada pelo Teste Exato de Fisher. No experimento 2, a taxa de gestação entre os grupos, após a 1ª e 2ª inovulações e acumuladas, foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. Considerou-se significativa probabilidade menores de 5%. Utilizou-se nas análises o programa SAEG (2002).

Este estudo possui aprovação pelo comitê de ética registrado sobre o número 08A/2014 (CEUA/IF Sul de Minas).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Eficiência da sincronização da onda folicular.

No primeiro experimento, os efeitos da utilização de 1mg se mostraram eficientes ($p < 0,05$), quando se compara com o grupo SF, no qual apenas foi colocado o implante de progesterona. Os resultados em provocar a atresia folicular e a sincronização da nova onda de desenvolvimento foram de 95,0 vs 15,0% para BE e SF, respectivamente. Resultados similares são vistos por Sá filho et al. (2013), Bó et al. (2002), Galvão et al. (2007) e Stevenson et al. (2003).

Nos dias subsequentes à aplicação do BE, as fêmeas apresentaram redução no diâmetro do maior folículo nos ovários (Figura 2), efeito não observado nos animais que receberam soro fisiológico, que mantiveram o desenvolvimento folicular. Foi observada diferença ($P > 0,05$) entre o diâmetro médio dos folículos nos dois tratamentos em D2 e D3, mostrando que o BE, na dose aplicada, promove atresia folicular. No grupo SF, 15% das fêmeas também apresentaram regressão folicular durante a avaliação.

A eficiência média de sincronização, considerada pela atresia folicular e pela posterior emergência de nova onda de desenvolvimento entre D4 e D5, foi

superior nos animais do grupo BE ($P>0,05$ – Tabela 1). Houve diferença tanto em vacas como em novilhas e nas categorias analisadas em conjunto.

A eficiência demonstrada pelo uso de 1 mg de benzoato de estradiol em promover a atresia folicular e a sincronização da nova onda folicular são também percebidos porBó et al. (2005).

Tabela 1: Eficiência média de sincronização do desenvolvimento folicular nos animais de diferentes categorias e em conjunto.

| Grupo | Categoria | | | | | | | | |
|-------|-----------|--------|-------------------|----------|--------|--------------------|-------|--------|-------------------|
| | Vacas | | | Novilhas | | | Total | | |
| | Trat. | Sincr. | Efic.(%) | Trat. | Sincr. | Efic.(%) | Trat. | Sincr. | Efic.(%) |
| BE | 10 | 9 | 90,0 ^a | 10 | 10 | 100,0 ^a | 20 | 19 | 95,0 ^a |
| SF | 10 | 2 | 20,0 ^b | 10 | 1 | 10,0 ^b | 20 | 3 | 15,0 ^b |

Letras iguais na coluna não diferem a 5% de probabilidade – Teste Exato de Fischer.

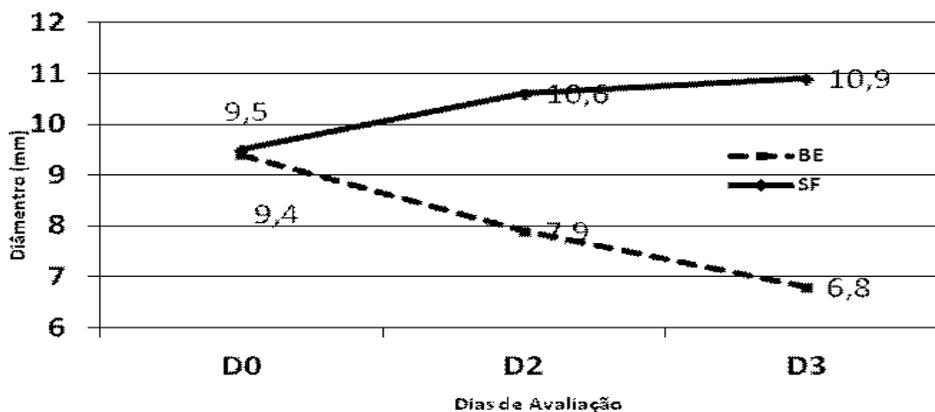
Assim como neste, em outro estudo que comparou a eficácia do BE, em doses de 0,5, 1 ou 2 mg / 500 kg de peso corporal para induzir nova onda folicular em vacas não lactantes, tanto 1 ou 2 mg de BE foram altamente eficazes (Bogacz et al., 2000).

Porém a capacidade de o estradiol induzir nova onda folicular é dependente das concentrações de progesterona em circulação. Isso foi demonstrado em vacas que receberam uma injeção de 1 mg de BE no dia 13 do ciclo estral e depois recebeu tratamento adicional, de uma doseluteolítico de PGF2 α quer 0, 24 ou 48 horas após a injeção de benzoato de estradiol (Burke et al., 1997).

Apenas uma fêmea não teve a onda de desenvolvimento folicular sincronizada com a aplicação de 1mg de BE neste estudo. Esse animal apresentava no momento da aplicação do produto um folículo com diâmetro de 14,2 mm. Possivelmente, essa situação de final de desenvolvimento folicular no

momento da aplicação contribuiu para que esta fêmea não respondesse. Nesses casos, segundo Burke et al. (2003), folículos ao final do desenvolvimento são menos dependentes do FSH para seu desenvolvimento. Como o efeito do BE para provocar a atresia folicular ocorre indiretamente pelo bloqueio na síntese de FSH, essa situação pode não ser eficiente para provocar atresia e sincronização do desenvolvimento folicular em fêmeas num período em que os folículos não dependam de gonadotropina (Sales et al., 2012).

Figura 2: Variação média do diâmetro do maior folículo após a aplicação de tratamentos com Benzoato de Estradiol ou Soro Fisiológico.



No grupo SF, 15% das fêmeas também apresentaram regressão folicular durante a avaliação. A explicação para que alguns animais do Grupo SF também tivessem atresia folicular durante o período de avaliação se deve ao fato de que se encontravam, no momento dos tratamentos, no final de uma onda de desenvolvimento folicular. De fato, esses animais, no D0, possuíam um folículo com diâmetro superior a 12mm, indicando que, fisiologicamente, na presença de progesterona elevada, essa estrutura sofreria atresia espontaneamente (Burke et al., 2003).

Em fêmeas zebuínas, Sá Filho et al. (2013) indicam que essa mesma quantidade de benzoato de estradiol, utilizado ao início de um protocolo de IATF,

forneceu taxas de gestação satisfatórias, embora o efeito específico do produto não tenha sido avaliado.

Os resultados deste estudo corroboram outros (Sá filho et al., 2013; Bó et al., 2002; Galvão et al., 2007; e Stevenson et al., 2003), indicando que o Benzoato de Estradiol, na dose de 1mg, é eficiente para provocar atresia folicular e emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular sincronizada, podendo, portanto, ser utilizado no início de um protocolo de tempo fixo.

Experimento 2: Eficiência do protocolo de resincronização.

Taxa de gestação na 1ª Inovação

Na 1ª inovação do segundo experimento, o protocolo utilizado forneceu resultados de taxa de gestação compatíveis com outros existentes na literatura (49,6% para o grupo resincronização versus 48,6% para o grupo controle), utilizando animais de categoria e de genética semelhantes (Bó et al., 2002). Quando se analisa a taxa de gestação das receptoras, no segundo experimento, após a 1ª inovação, não foi vista diferença entre o grupo RES e CONT ($P > 0,05$ – Tabela 2). Isso já era esperado já que até a 1ª inovação os procedimentos aplicados a um grupo foram feitos igualmente ao outro. Contudo, é possível observar que iniciar protocolo de resincronização antes do conhecimento do estado gestacional da receptora não interferiu nos resultados dessa primeira inovação.

Tabela 2: Taxa de gestação de receptoras de embrião após 1ª inovação, nos diferentes tratamentos resincronizado (RES) e controle (CONT)

| Tratamento | Total de animais | Gestações (n e %)* |
|------------|------------------|-------------------------|
| RES | 137 | 68 - 49,6% ^a |
| CONT | 138 | 67 - 48,6% ^a |

Não significativo a 5% de probabilidade.

Segundo Galvão et al. (2007), a principal questão técnica dos protocolos de ressincronização, iniciados em fêmeas com situação de gestação desconhecida, ou seja, antes do diagnóstico de prenhez, diz respeito à aplicação de produtos em fêmeas no início da gestação, o que realmente merece atenção.

Estudos anteriores (Munro et al., 1985; El-Zarkouny et al., 2004) indicam alteração na produção de progesterona pelo corpo lúteo quando se aplicou um análogo do estradiol. Possivelmente, encontrou esse efeito por ter sido usada quantidade maior de um análogo do estradiol ou por este ter sido aplicado em um período diferente após a ovulação.

Contudo, resultados positivos são encontrados nesse e em outros estudos, contrapondo-se a outros com resultados negativos quanto ao uso do estradiol. Resultados divergentes podem estar sendo influenciados pelo protocolo definido a se usar e pelo momento da sua aplicação. Segundo alguns autores (Araújo et al., 2009; Robinson et al., 2001; e Bazer et al. 2009), o mecanismo luteolítico que o estrógeno pode desencadear, já está estabilizado no início gestação (20 dias pós inseminação), pós o reconhecimento materno dessa gestação (15 a 19 dias pós inseminação) (Marques et al., 2007).

Taxa de gestação na 2ª Inovulação

A taxa de gestação após a segunda inovulação foi de 47,8% para o grupo ressincronização e 45,1% para o grupo controle, resultando em uma acumulada, de 73,7% para o primeiro e 71,7% para o segundo, em que não se verifica diferença ($P > 0,05$ - Tabela - 3).

Tabela 3: Taxa de gestação de receptoras de embrião após 2ª inovulação, nos diferentes tratamentos ressincronizado (RES) e controle (CONT).

| Tratamento | Total de animais | Gestações (n e %)* |
|------------|------------------|-------------------------|
| RES | 69 | 33 - 47,8% ^a |
| CONT | 71 | 32 - 45,1% ^a |

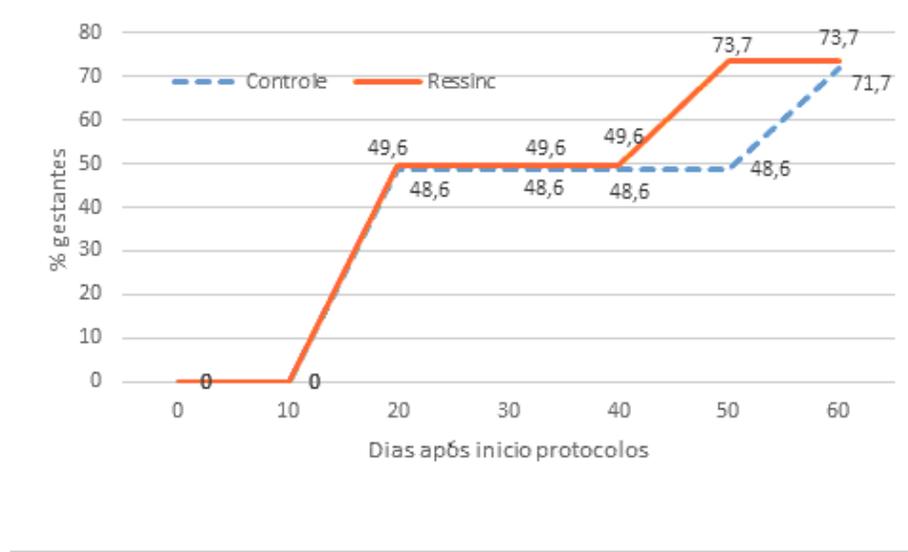
Não significativo a 5% de probabilidade.

Esses resultados reforçam a afirmação de que a ressincronização antes do 1º diagnóstico de gestação não interfere na manutenção da gestação que está em curso quando o protocolo é utilizado, assim como na fertilidade futura dessas fêmeas. Outros estudos, utilizando IATF, também indicam que a ressincronização em fêmeas antes do diagnóstico de gestação não interfere na fertilidade desses animais e pode aumentar o número de fêmeas gestantes (Sá Filho et al., 2013; Galvão et al., 2007;).

Diversos estudos nesse sentido demonstraram resultados similares aos de Galvão et al. (2007) com taxa de prenhez semelhantes entre D31 e D61 após a IA, indicando que o tratamento em vacas leiteiras em lactação e com status de prenhez desconhecida não teve efeito sobre a possível gestação quando utilizada inserção de progesterona, ECP e GNRH, e Sá Filho et al. (2013) relatam que a ressincronização aumenta a taxa de serviço e reduz o intervalo das inseminações. Em seu estudo, 75% das vacas ressincronizadas estavam gestantes com apenas 32 dias de estação de monta. Resultados no mesmo sentido também são vistos por Cavalieri et al., (2007), Green et al., (2010) e Colazo et al. (2006).

Diante desses resultados (Figura - 3), protocolos de ressincronização como os utilizados podem ser iniciados em receptoras de embrião mesmos antes do diagnóstico de gestação, e concluídos apenas naquelas fêmeas diagnosticadas não gestantes ao final do protocolo, quando se realizada o diagnóstico. Nesse caso, pode-se antecipar, sem riscos, a reutilização dos animais não gestantes (Sá Filho et al., 2013).

Figura 3: Evolução da porcentagem de vacas gestantes.



Na ressincronização, o novo protocolo é iniciado mesmo antes do diagnóstico de gestação, visando ganho de tempo com redução no tempo que as fêmeas não gestantes permanecem não servidas (Sá Filho et al., 2014). Segundo Viana et al. (2010), os custos de manutenção de receptoras em um programa de multiplicação genética de bovinos por embriões estão entre os principais, além de que a oferta desses animais em quantidade e qualidade é um dos principais fatores limitantes à disseminação da PIVE. Essa dificuldade seria minimizada já que a ressincronização possibilita o reaproveitamento precoce da receptora.

Quando se comparam os tratamentos após a segunda inovulação, nota-se que esse procedimento foi antecipado em 8 dias sem redução na eficiência, como demonstrado pelos resultados de taxa de gestação. Na ressincronização convencional, a 2ª inovulação acontece no D58; já com a ressincronização antes de conhecer o estado gestacional da vaca, acontecerá no D50. Como consequência, teríamos um número menor de receptora por embrião produzido e uma economia na realização da técnica.

Segundo Fernandes (2016), o custo médio de manutenção diário de uma receptora é de R\$5,77, considerando o valor da ocupação da pastagem (R\$2,15), da mão de obra para manejo (R\$0,60), da nutrição (R\$1,80),

dos medicamentos (R\$0,75) e da depreciação e riscos (R\$0,47), levando-se em conta que a ressincronização aplicada a animais com condição de gestação desconhecida aumenta apenas o custo da aplicação de parte do protocolo naquelas receptoras que estavam gestantes, que é de cerca de R\$5,30/animal. Calculando uma situação em que 50% das receptoras ficariam gestantes na 1ª TE, esse custo adicional da ressincronização seria apenas para esses animais. Assim sendo, é possível fazer a seguinte simulação (Tabela 4).

Tabela 4: Simulação de resultados financeiros utilizando os dados de taxa de gestação obtidos no tratamento ressincronizado.

| Variável | Valor | Custo | Benefício |
|--|-------------|-----------|-------------|
| Número inicial de animais | 137 | | |
| Taxa de gestação na TE anterior | 49,6% | | |
| Animais ressincronizados | 68 | | |
| gestantes | | | |
| Custo adicional da ressincronização | R\$5,30 | | |
| Total adicional gasto ressincronização | R\$5,30x68 | R\$360,40 | |
| Taxa de gestação na 2ª TE | 47,8% | | |
| Receptoras gestantes | 33 | | |
| Ressincronização | | | |
| Dias ganho em cada receptora | 8 | | |
| Custo de manutenção diária | R\$5,77 | | |
| Total de dias ganhos | 33x8 = 264 | | |
| Ganho total com ressincronização | R\$5,77x264 | | R\$1.523,28 |
| Diferença final | | | R\$1.162,88 |

Tais dados demonstram que a ressincronização traz uma economia nos custos da técnica de multiplicação genética por embriões, o que pode tornar a técnica mais viável e acessível aos produtores. Em locais onde as receptoras são

as próprias vacas do rebanho leiteiro da propriedade, comum em pequenos produtores, a ressincronização pode apresentar um retorno financeiro ainda maior, visto que as vacas retornarão à lactação mais cedo.

A aplicação do protocolo de ressincronização, conforme proposto, pode antecipar a gestação em receptoras de embrião. Considerando o estabelecimento da gestação no dia da ovulação induzida pelos protocolos, ao se analisar o tempo gasto do início do estudo até o estabelecimento da gestação nos dois grupos, percebe-se que, embora não existam diferenças entre a taxa de gestação nos grupos, aquelas fêmeas que foram ressincronizadas antes do 1º diagnóstico de gestação tiveram um tempo reduzido, desde o início do 1º protocolo até o estabelecimento da gestação. Resultados semelhantes, aumentando a taxa de prenhes e reduzindo o intervalo parto/concepção, com outros protocolos de ressincronização, são relatados por Galvão et al. (2007) e Cavalieri et al. (2007), trabalhando com IATF em fêmeas leiteiras.

CONCLUSÃO

A aplicação de 1mg de benzoato de estradiol é eficiente para promover sincronização de onda de desenvolvimento folicular ao início de protocolos de tempo fixo. A utilização do protocolo de ressincronização proposto, em fêmeas, com estado gestacional desconhecido, é seguro, visto que não interfere na manutenção da prenhez e pode antecipar a reutilização dessas fêmeas, permitindo que se obtenham mais animais gestantes em um menor tempo, trazendo economia e viabilidade à técnica de PIVE.

AGRADECIMENTOS

CNPq, Capes e BIOTRAN.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, R.R.; GINTHER, O.J.; FERREIRA, J.C et al. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *BiolReprod.*, v.81, p.426–37, 2009.

BAZER, F.W.; SPENCER T.E.; JOHNSON, G.A.et al. Novel pathwaysforimplantationand establishment andmaintenance of pregnancy in mammals.*Mol Human Reprod.*, v.16, p.135-152, 2009.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72,2002.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod.Sci.*, v.39, p.193–204, 2005.

BOGACZ, U.L.; HUSTON, J.E.; GRUN, D.E et al.Effect of estradiol benzoate in combination bwith progesterone to induce follicular turnover as various stages of the estrous cycle.*J. Anim. Sci.*,v. 78, p.211, 2000.

BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GASSER, C.L.et al. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*, v. 60, p.647–658, 2003.

BURKER, C.R; DAY, M.L.; CLARK, B.A et al.Effect of luteolysis on follicle wave control using oestradiol benzoate in cattle.*Proc. N.Z. oc. Endrocino*, v.40, p.134, 1997.

CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K.A.; FRICKE, P.M.et al.Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms.*J. Dairy Sci.*,v. 89, p.4723-4735, 2006.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; SMART, V.M. et al. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device for 7 or 8d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24h after removal. *Theriogenology*, v.67, p.824–834, 2007.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A. et al. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.60, p.1389-1399, 2003.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAINAR-JAIME, R.C. et al. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*, v.65, p.557-572, 2006.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A. et al. Pregnancy in Dairy Cows After Synchronized Ovulation Regimens With or Without Presynchronization and Progesterone. Department of Animal Sciences and Industry Kansas State University, Manhattan 66506-020, *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1024–1037, 2004.

FERNANDES, C.A.C.; VELASQUEZ, L.F.U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação em receptoras de embrião. *Archivos de Reproduccion Animal*, v.1, p.28-31, 1997.

GALVÃO, K.N.; SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L. et al. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. *J Dairy Sci.*, v.90, p.4240–4252, 2007.

GREEN, J. C.; OKAMURA, C.S.; POOCK, S.E. et al. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis

within 18–20 d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.121, p.24-33, 2010.

MARQUES, V.B.;BERTAN, C.M.; ALMEIDA, A.B.et al. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.4, p. 479-488, 2007.

MUNRO, R.K.; MOORE, N.W. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. *J ReprodFertil*, v.73, p.353–359, 1985.

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

SÁ FILHO, M.F.; MARQUES, M.O.; GIROTTO B.R. et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*, v.81, p.284-290, 2013.

SÁ FILHO, M.F.; VIEIRA, L.M.; GUEREIRO, B.M.et al. Biotécnicas da reprodução para melhorar a fertilidade da vaca leiteira. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2014, Porto Alegre. *Anais...* PortoAlegre : Gráfica Ufrgs, 2014. p.152-188.

SALES, J.N.; CARVALHO, J.B.; CREPALDI, G.A.et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bosindicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*,v.78, p.510–516, 2012.

SILVA, E.; STERRY, R.A.; KOLB, D.et al. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.4612-4622, 2007.

SINEDINO, L.D.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.et al. Effect of early or late resynchronization based on different methods of pregnancy diagnosis on reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci*,v.97, p.4932-4941, 2014.

STEVENSON, J.S.; JOHNSON.S.K.; MEDINA-BRITOS, M.A.et al. Resynchrnonization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both.*J Anim Sci.*, v.81, p.1681-1692, 2003.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M. P. etal.Use of in vitro fertilization Technique in the least decade and is Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. *ActaScientialVeterinariae*, v.38, p.661-674, 2010.