

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
LEANDRO FRANCISCO GOFERT

**ANÁLOGO DE GNRH EM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO LENTA PARA
INDUÇÃO DE CRESCIMENTO FOLICULAR EM FÊMEAS BOVINAS EM
ANESTRO**

Alfenas, MG

2015

LEANDRO FRANCISCO GOFERT

**ANÁLOGO DE GNRH EM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO LENTA PARA
INDUÇÃO DE CRESCIMENTO FOLICULAR EM FÊMEAS BOVINAS EM
ANESTRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Reprodução, sanidade e bem estar animal da
Universidade José do Rosário Vellano – *campus* Alfenas/MG
para obtenção do título de Mestre .

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Varago

Alfenas, MG

2015



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "ANALAGO DE GNRH EM VEÍCULO DE LIBERAÇÃO LENTA PARA INDUÇÃO DO CRESCIMENTO FOLICULAR EM FÊMEAS BOVINAS EM ANESTRO".

Autor: Leandro Francisco Gofert

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Cristina Varago

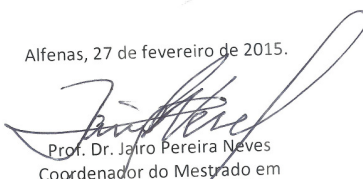
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA – REPRODUÇÃO ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Fabiana Cristina Varago
Orientadora


Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes

Prof. Dr. Renato Valentim

Alfenas, 27 de fevereiro de 2015.


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

Gofert, Leandro Francisco

Análogo de GnRH em veículo de liberação lenta para indução de crescimento folicular em fêmeas bovinas em anestro .—Leandro Francisco Gofert.—Alfenas, 2015.

53 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Cristina Varago

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
Reprodução ,Sanidade e Bem Estar Animal- Universidade José
do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.

1. Vacas de corte 2. GnRH 3. Folículo 4. Reprodução
I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título
CDU : 636.082(043)

Agradecimentos

À minha família, esposa e amigos.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Varago pelo apoio, oportunidade, carinho e profissionalismo com que me conduziu no período de orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Antonio de Carvalho Fernandes e sua equipe da Biotran pelo apoio em toda a execução do experimento, bem como pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Cássio e Renato do Laboratório Grascon pelo incentivo, pelos conselhos e ajuda na execução dessa dissertação.

Aos professores do Departamento de Pós-Graduação, pelos valiosos ensinamentos dispensados durante o período de mestrado.

À Universidade José do Rosário Vellano, pela excelente estrutura e qualidade de seu corpo docente que muito me auxiliou durante este período de pós-graduação.

À Fazenda Vitória e a todos seus colaboradores, pela cessão de animais para o experimento, tornando possível a execução desse trabalho de dissertação.

À CRV Lagoa e ao amigo Cezar Von Zuben pelas doses de sêmen bovinas gentilmente doadas para o experimento.

A todos os colegas de pós-graduação que muito me auxiliaram durante este período de convívio com suas experiências, sugestões e, principalmente, amizade.

A Deus pelo dom da vida, saúde e capacidade de desenvolvimento que me foram concedidos.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chic

RESUMO

GOFERT, Leandro Francisco. **Análogo de GnRH em veículo de liberação lenta para indução de crescimento folicular em fêmeas bovinas em anestro.** Orientadora: Fabiana Cristina Varago. Alfenas: UNIFENAS, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Reprodução Animal).

Para testar um novo indutor de crescimento folicular sobre o aumento do crescimento folicular, a taxa de ovulação e prenhez em vacas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Associou-se um análogo de GnRH (gonadorelina, Fertagyl[®], MSD, São Paulo, Brasil) diluído em solução de hialuronato de sódio a 20%. Foram utilizadas 27 vacas Nelore, lactantes, com escore de condição corporal (ECC) de 2,5 (escala de 1 a 5), em anestro (fol. < 8 mm e ausência de corpo lúteo). No dia 0 todas as vacas receberam um dispositivo de progesterona (Primer[®] - Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®] - Tecnopec, São Paulo, Brasil). Oito dias depois foram avaliadas por ultrassom e divididas em 3 grupos, equilibrando-se os grupos pela condição folicular. Nesse dia todos os animais tiveram seus dispositivos removidos e receberam 500 µg de Cloprostenol sódico (Ciosin[®] - MSD, São Paulo, Brasil). No grupo G100 foi aplicada por via IM a solução indutora de crescimento com 100 µg de gonadorelina. No G200 foi aplicada a solução indutora de crescimento com 200 µg de gonadorelina. No grupo controle (GC) foi aplicado 2 ml de solução fisiológica. No dia 9 os animais receberam 1 mg de benzoato de estradiol como indutor de ovulação. Todos os animais foram inseminados no dia 10, 54 h após a retirada dos dispositivos. Nos dias 9 e 10 os animais foram avaliados por ultrassonografia para mensuração folicular, no dia 19 para identificação de corpo lúteo (taxa de ovulação) e no dia 44 para diagnóstico de gestação. O diâmetro folicular não diferiu entre os grupos no D0: 5,2±1,16 mm vs. 5,8±1,45 mm vs. 5,2±1,55 mm; no D8: 7,3±1,83 mm vs. 8,2±1,67 mm vs. 7,4±1,60 mm; no D9: 9,2±1,69 mm vs. 9,6±1,55 mm vs. 9,2±1,18 mm, respectivamente para G100, G200 e GC. O crescimento folicular entre o dia 8 e 9 também não diferiu entre os grupos: 1,9 mm vs. 1,4 mm vs. 1,8 mm, para G100, G200 e GC respectivamente. As vacas tratadas com GnRH, avaliadas no D10, tiveram antecipação da ovulação em relação ao GC: 100% vs. 77,8% vs. 0%, respectivamente para G100, G200 e GC. A taxa

de ovulação avaliada pela presença de CL no D19 não diferiu entre os grupos: 100% vs. 77,8% vs. 77,8% respectivamente para G100, G200 e GC. Os diâmetros dos corpos lúteos também não diferiram quando avaliados no D19: $1,56 \pm 0,24$ mm vs. $1,68 \pm 0,40$ mm vs. $1,51 \pm 0,30$ mm, respectivamente para G100, G200 e GC. A taxa de prenhez foi superior no GC em relação aos tratados: 33,4% vs. 0 vs. 0, respectivamente para GC, G100 e G200. Os dados sugerem que, a associação entre análogo de GnRH e hialuronato a 20% (nas doses testadas) não aumentou o crescimento folicular, nem a taxa de ovulação. Provavelmente essa associação induziu um pico precoce de LH, levando à ovulação antecipada e prejudicando as taxas de prenhez dos animais tratados.

Palavras chave: Vacas de corte; GnRH; Hormônios; Folículo; Reprodução.

ABSTRACT

GOFERT, Leandro Francisco. **GnRH analogue in slow release vehicle for follicular growth induction in anestrus cows.** Leader: Fabiana Cristina Varago. Alfenas: UNIFENAS, 2015. Dissertation (Master in animal science, Concentration area: Animal Reproduction).

To test a new follicular growth inducer on the increase of follicular growth, the rate of ovulation and pregnancy in cows submitted to fixed time artificial insemination (FTAI). Was associated with a GnRH analogue (gonadorelin, Fertagyl®, MSD, São Paulo, Brazil) diluted in 20% sodium hyaluronate solution. It was used 27 Nellore cows, lactating, body condition score (BCS) of 2.5 (range 1-5) in anoestrus (fol. <8 mm and absence of corpus luteum). On day 0 all cows received a progesterone device (Primer® - Tecnopec, São Paulo, Brazil) and 2 mg of estradiol benzoate (RIC-BE® - Tecnopec, São Paulo, Brazil). Eight days later were evaluated by ultrasound and divided into 3 groups, balancing groups by follicular condition, that day all animals had their devices removed and received 500 g of sodium Cloprostenol (Ciosin® - MSD, São Paulo, Brazil). In the G100 group was administered intramuscularly the priming solution of growth with 100 µg of gonadorelin. In the G200 was applied to priming solution of growth with 200 µg of gonadorelin. In the control group (CG) was applied 2 mL of saline solution. On day 9 the animals received 1 mg of estradiol benzoate as ovulation inducer. All animals were inseminated on day 10, 54 h after removal of the devices. In day 9 and 10 the animals were evaluated by ultrasound for follicular measurement, on day 19 for corpus luteum ID (ovulation rate) and day 44 for pregnancy diagnosis. Follicular diameter did not differ between groups at D0: 5.2 ± 1.16 mm vs. 5.8 ± 1.45 mm vs. 5.2 ± 1.55 mm; at D8: 7.3 ± 1.83 mm vs. 8.2 ± 1.67 mm vs. 7.4 ± 1.60 mm; in D9: 9.2 ± 1.69 mm vs. 9.6 ± 1.55 mm vs. 9.2 ± 1.18 mm, respectively, for G100, G200 and GC. Follicular growth between day 8 and 9 also did not differ between groups: 1.9 mm vs. 1.4 mm vs. 1.8 mm, for G100, G200 and GC respectively. The cows treated with GnRH, evaluated in the D10, had anticipation of ovulation in relation to GC: 100% vs. 77.8% vs. 0%, respectively, for G100, G200 and GC. The ovulation rate determined by the presence of CL in the D19 did not differ between the groups: 100% vs. 77.8% vs.

77.8% respectively for G100, G200 and GC, the diameters of corpora lutea differ, when evaluated in D19: 1.56 ± 0.24 mm vs. 1.68 ± 0.40 vs. 1.51 ± 0.30 mm, respectively, for G100, G200 and GC. The pregnancy rate was higher in GC than those treated: 33.4% vs. 0 vs. 0, respectively for GC, G100 and G200. The data suggest that the association between the GnRH analogue and hyaluronate 20% (at the doses tested) did not increase follicular growth or ovulation rate. Probably this association induced a premature LH surge, leading to early ovulation and harming the pregnancy rates of the treated animals.

Keywords: Beef Cows; GnRH; Hormones; Follicle; Reproduction.

Lista de figuras

Figura 1.1 - Formação de cadeias entrelaçadas de hialuronato que retém as proteínas em seu interior, proporcionando uma liberação gradual das mesmas, pág. 25.

Figura 2.1 - Exames ultra-sonográficos realizados na vaca 78 (G200) nos dias 8, 9 e 10, pág. 48.

Lista de tabelas

Tabela 1.1 - Intervalos entre a aplicação de indutores de ovulação, aparecimento do estro, o surgimento do pico de LH e ovulação em fêmeas bovinas, pág. 20.

Tabela 1.2 - Resposta superovulatória de vacas de corte tratadas com 400 mg de FSH, 2 vezes ao dia por 4 dias ou numa injeção associada a veículo de liberação lenta (hialuronato a 20%), pág 26.

Tabela 2.1 - Média do diâmetro do folículo dominante observado nos intervalos para os três grupos experimentais, pág. 46.

Tabela 2.2 - Taxa de ovulação, taxa de ovulação antecipada, tamanho dos corpos lúteos e taxa de prenhez observadas nos 3 grupos experimentais, pág 48 .

Lista de abreviaturas e siglas

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas.

ECC – Escore de condição corporal.

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo.

Fol. – Folículo.

CL – Corpo lúteo.

US – Ultrassom.

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial.

eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina.

FSH – Hormônio folículo estimulante.

LH – Hormônio luteinizante.

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1.

IGFBP – Proteínas de ligação relacionadas ao IGF.

P4 – Progesterona.

GH – Hormônio do crescimento.

NPY – Neuro-peptídeo Y.

IM – Injeção intramuscular.

SC – Injeção subcutânea.

DP4 – Dispositivo de liberação lenta de progesterona.

D0 – Dia 0 do experimento.

D8 – Dia 8 do experimento.

D9 – Dia 9 do experimento.

D10 – Dia 10 do experimento.

D19 – Dia 19 do experimento.

D44 – Dia 44 do experimento.

Ov. – Ovulação.

GC – Grupo Controle.

G100 – Grupo tratado com 100 microgramas de GnRH.

G200 – Grupo tratado com 200 microgramas de GnRH.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Fisiologia do ciclo estral bovino.....	19
3.2. Manipulação do ciclo estral bovino.....	20
3.3. Controle do recrutamento folicular.....	20
3.4. Controle da ovulação de folículos.....	21
3.5. Anestro pós parto em vacas de corte zebuínas.....	22
3.6. Metabolismo e suas interações na reprodução.....	24
3.7. Técnicas hormonais para incremento dos resultados de programas de IATF ..	24
3.8. Uso de análogo de GnRH para induzir ciclicidade em vacas em anestro.....	25
3.9. Novos veículos para aumentar o tempo de ação de proteínas e peptídeos.....	29
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

CAPÍTULO 2

2.1. Artigo enviado à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) – Qualis B1 Situação: a ser submetido.....	37
--	-----------

1 Introdução

O mercado brasileiro da Inseminação artificial em bovinos vem apresentando um crescimento considerável nos últimos 5 anos, principalmente pela disseminação dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Essa tecnologia, cuja aplicação a campo começou por volta de 15 anos atrás, hoje em dia, é responsável por cerca de 60% da demanda por doses de sêmen comercializadas no Brasil, segundo relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2013).

Os protocolos de IATF são, ano a ano, aperfeiçoados tecnicamente através de inúmeras pesquisas que associam os profissionais de campo, as universidades e as empresas farmacêuticas. A alta demanda e intensas pesquisas fizeram com que a técnica se tornasse bastante conhecida pelos profissionais de campo e hoje a IATF é uma tecnologia consolidada no mercado pecuário brasileiro.

Um dos desafios ao se utilizar essa tecnologia a campo está nas condições ambientais e nutricionais às quais a grande maioria dos rebanhos bovinos brasileiros é submetida. Ambientes tropicais e pastagens de baixa qualidade não atendem plenamente às necessidades nutricionais, principalmente das vacas recém-paridas, fase na qual a demanda energética e protéica é bastante acentuada pela amamentação. Além disso, é notório que vacas zebuínas (grande maioria do rebanho brasileiro) são mais tardias na retomada da ciclicidade pós-parto, quando comparadas a vacas taurinas.

Dessa forma, é comum que as vacas demorem a apresentar atividade cíclica após o parto, o que faz com que os protocolos de IATF sejam frequentemente aplicados em rebanhos com altas taxas de anestro.

Este desafio vem sendo superado através da adição de hormônios que auxiliam o crescimento folicular das fêmeas em anestro, como a gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Baruselli et al., 2001) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (Santos et al., 2008).

A utilização de gonadotrofinas exógenas em programas de IATF é considerada fundamental em vacas de corte com bezerros ao pé para a melhoria de resultados.

É conhecido pelos pesquisadores que vacas zebuínas de corte criadas a pasto, com bezerro ao pé, frequentemente apresentam baixas taxas de ciclicidade (anestro), no período em que as biotecnologias da reprodução, como a IATF, são aplicadas (de 30 a 90 dias pós-parto).

Dessa forma, vários trabalhos demonstram que a aplicação de protocolos de IATF sem a utilização da eCG apresentam resultados inconsistentes nessa categoria animal (vacas de corte lactantes), enquanto protocolos associando a eCG conseguem resultados mais consistentes.

Uma característica associada ao uso da eCG, dentro do protocolo IATF, é que ela promove um encarecimento considerável da técnica, pois ela representa porcentagem vultosa do custo atual de um protocolo no mercado brasileiro (estima-se em mais de 50% do custo total).

Além do mais, a extração da eCG é vista com reservas. Essa gonadotrofina é extraída do sangue de éguas gestantes, durante o primeiro terço da gestação. Esse manejo de sangria de éguas gestantes está proibido em países Europeus e na Austrália. Em futuro próximo, outros locais importantes de extração (como Argentina, Uruguai e China) podem sofrer pressões de organizações de bem estar animal, que podem resultar em leis que proíbam sua extração.

O mercado brasileiro de programas de IATF movimentou mais de 7,5 milhões de protocolos em 2013 (ASBIA, 2013), onde se estima que entre 50 e 70% destes protocolos utilizaram também a eCG. Logo, a obtenção de uma alternativa a este produto, que seja viável do ponto de vista econômico e do ponto de vista do bem estar animal, pode gerar benefícios evidentes à pecuária nacional, tanto para criadores como para os técnicos.

Nesse sentido, trabalhos desenvolvidos utilizando preparações contendo FSH e LH suínos, em substituição a eCG, têm demonstrado resultados irregulares de prenhez, existindo trabalhos onde essa substituição foi plenamente exitosa, bem como, em outros trabalhos, o efeito da eCG foi estatisticamente superior às preparações contendo FSH e LH suínos.

Nesse trabalho busca-se investigar se a suplementação de GnRH, associada a um veículo que proporcione a liberação lenta e prolongada deste peptídeo (simulando o que aconteceria em vacas cíclicas), pode aumentar a secreção pulsátil de LH pela hipófise,

resolvendo a principal causa de anestro e resultando em maiores taxas de crescimento folicular, maiores taxas de ovulação e consequentemente de prenhez em programas de IATF aplicados às vacas de corte lactantes.

2 Objetivo

O objetivo do trabalho foi verificar a eficiência de uma formulação contendo análogo de GnRH (gonadorelina) associado a veículo glicosaminoglicano (hialuronato a 20%) em protocolo de IATF (retirada dos dispositivos), em vacas de corte acíclicas.

As variáveis testadas foram:

- Diâmetro do folículo dominante no dia 8 (retirada do DP4) e no dia 9.
- Taxa de crescimento folicular do dia 8 ao 9 e do dia 9 ao 10.
- Diâmetro do folículo ovulatório (D10).
- Taxa de antecipação da ovulação, caracterizada pela ovulação antes do horário previsto.
- Taxa de ovulação, caracterizada pela presença de CL (D19).
- Diâmetro dos corpos lúteos no dia 19.
- Taxa de prenhez, caracterizada pela presença de embrião no útero, aos 34 dias após a inseminação.

3 Revisão de literatura

3.1. Fisiologia do ciclo estral bovino

O crescimento de folículos antrais em bovinos é caracterizado por ondas foliculares, compreendidas pelos processos de recrutamento, seleção, dominância, divergência e culminando com atresia ou ovulação (GONÇALVES et al., 2010).

O folículo dominante se desenvolve por ação do FSH até o aumento na produção de estrógeno e inibina, provocando uma redução dos níveis séricos de FSH (MARTIN et al., 1988; GINTHER et al., 1989). Além do mecanismo endócrino, a seleção da dominância folicular ocorre por regulação autócrina e parácrina. Esses mecanismos não estão ainda compreendidos em sua totalidade, mas já foi estabelecido que inibina, ativina, fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e suas proteínas de ligação (IGFBP) estão envolvidas e atuam diretamente nas células da teca e granulosa, modulando o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese. O crescimento do folículo dominante e o incremento da produção de estrógeno e inibina estão acompanhados pela diminuição nos níveis de ativina e IGFBP, simultaneamente com o aumento nas concentrações de IGF-I livre (GONÇALVES et al., 2010).

Há evidências de que a inibina, ativina e IGFBP-2, -4 e -5 (IGFBPs de baixo peso molecular) têm efeito negativo no desenvolvimento folicular e que a atresia folicular está associada a elevadas concentrações dessas IGFBPs (GIUDICE, 1992; MONGET et al., 1996; RIVERA et al., 2001; FORTUNE, et al., 2001).

Esses fatores são regulados em resposta às gonadotrofinas hipofisárias (ROCHE, 1996; EVANS & FORTUNE, 1997). A liberação de FSH é independente da liberação de GnRH, mas é regulada pela secreção de estrógeno e inibina provenientes do folículo dominante; porém, os pulsos de LH ocorrem concomitante com os pulsos de GnRH, esse último controlado pela secreção de estrógeno e progesterona (P4) e suas interações com neuro-hormônios (CUPP et al., 1995; SCHAMS & BERISHA, 2002).

Os eventos de crescimento folicular e maturação final dos folículos podem ser observados principalmente devido ao contraste no sistema secretório dos hormônios sintetizados e armazenados na hipófise anterior. Enquanto o sistema secretório do LH é

absolutamente dependente da pulsatilidade do GnRH, a secreção do FSH parece ser regulada por dois mecanismos, um de controle basal e outro controle pulsátil, que confere a esse hormônio uma certa independência em relação aos pulsos de GnRH (PADMANABHAN & MCNEILLY, 2001).

3.2. Manipulação do ciclo estral bovino

O entendimento da fisiologia do ciclo estral bovino possibilitou que o mesmo fosse manipulado de forma a aumentar a eficiência reprodutiva em intervenções pecuárias. Entende-se por manipulação do ciclo estral a interferência humana visando alterar sua duração. Tal alteração se dá pela interferência na sequência cronológica natural das ondas dentro de um ciclo e das fases dentro de cada onda de crescimento folicular (BINELLI et al., 2006).

Exemplos de finalidades práticas das manipulações são: sincronização de ovulações para inseminação artificial em tempo fixo (BARUSELLI et al., 2004) ou transferência de embriões em tempo fixo (BÓ et al., 2002), superovulação de doadoras (BÓ et al., 2006), controle da progesteronemia (MARQUES et al., 2002) e controle da luteólise (BINELLI et al., 2001; MACHADO et al., 2006; BISINOTTO et al., 2006; IBIAPINA et al., 2006).

Para as manipulações do ciclo estral bovino são comumente utilizadas estratégias farmacológicas. Tais estratégias consistem em protocolos de tratamentos hormonais, aplicados em uma sequência pré-definida, visando um ou mais efeitos específicos, como por exemplo, controlar o recrutamento, a seleção, a ovulação ou a atresia folicular (BINELLI et al., 2006).

3.3. Controle do recrutamento folicular

O recrutamento de uma nova onda depende do término da onda anterior, ou seja, da eliminação dos efeitos supressivos causados por folículos em estádios mais adiantados de crescimento folicular (BINELLI et al., 2006). A eliminação de tais folículos pode ser alcançada de diferentes maneiras e sua eficiência depende da fase da onda de

crescimento folicular (TWAGIRAMUNGU et al., 1995; MARTINEZ et al., 1999). Em qualquer onda de crescimento folicular, após a seleção os FD ganham capacidade de responder ao LH e ovular. Após a ovulação, segue a liberação de um pulso de FSH que leva à emergência de uma nova onda um dia após (ADAMS et al., 1992b). Dessa forma, tratamentos com GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995), LH (MARTINEZ et al., 1999; GOISSIS et al., 2004) ou hCG (DIAZ et al., 1998) causam a ovulação e o recrutamento de novos folículos. A eficiência ovulatória de tratamentos com GnRH e LH variou, dependendo se a aplicação foi realizada dia 3, 6 ou 9 do ciclo estral (MARTINEZ et al., 1999). Na ausência de ovulação, o recrutamento da nova onda ocorreu espontaneamente conforme esperado. Em contraste ao GnRH ou LH, o efeito dos estrógenos é independente do estágio do ciclo estral ou da onda de desenvolvimento folicular (revisado por BÓ et al., 1995). A aplicação de estrógenos causa, inicialmente, uma supressão na secreção tanto de FSH quanto de LH (MARTINEZ et al., 2003), levando à atresia dos folículos. Segue a liberação de um pico de FSH e, conseqüentemente, o recrutamento de uma nova onda. O intervalo entre a aplicação do estrógeno e o recrutamento da nova onda depende da dose administrada e da natureza do estrógeno, sendo maior para doses maiores e para valerato de estradiol, benzoato de estradiol e E2, nessa ordem (MARTINEZ et al., 2005). O controle do recrutamento folicular é utilizado em um grande número de protocolos visando IATF (BARUSELLI et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2004; MOORE & THATCHER, 2006), TETF (BÓ et al., 2002 & 2006) e o retardamento da luteólise (BINELLI et al., 2001 & 2005; MACHADO et al., 2006).

3.4. Controle da ovulação de folículos

Para que ocorra a ovulação é necessário que um folículo dominante seja exposto a um pico de LH. Pode-se programar a presença de um folículo dominante com capacidade ovulatória programando-se anteriormente o recrutamento da onda de crescimento folicular pelos métodos descritos acima (BINELLI et al., 2006). Na ausência de P4, a ovulação ocorrerá espontaneamente. Assim, formas de se programar a ovulação incluem a indução farmacológica da luteólise utilizando-se prostaglandina F2 α ou seus análogos

sintéticos (PGF) ou a remoção de um dispositivo contendo P4 ou progestágenos, como o norgestomet, em animais previamente tratados com análogos da PGF. Para se controlar mais precisamente o momento da ovulação é comum utilizar-se em protocolos de IATF e TETF algum agente indutor da ovulação. Para esse fim, comumente utilizam-se estrógenos (LAMMOGLIA et al., 1998), GnRH (PURSLEY et al., 1995) ou LH (BROGLIATTI et al., 1998).

Tabela 1. Intervalos entre a aplicação de indutores de ovulação, aparecimento do estro, o surgimento do pico de LH e ovulação em fêmeas bovinas:

Hormônio	Tratamento ao estro	Tratamento ao pico LH	Tratamento à ovulação	Referências
Cipionato de estradiol	27 - 30 h	40 - 46 h	60 - 75 h	PANCARCI et al., 2002.
Benzoato de estradiol	28 - 30 h	22 - 24 h	45 - 50 h	CAVALIERI & MACMILLAN, 2002.
GnRH	-	2 - 3 h	24 - 34 h	IRVIN et al., 1981
LH	-	-	16 - 24 h	MCDUGALL et al., 1995

3.5. Anestro pós-parto em vacas de corte zebuínas

No período pós-parto precoce (10-20 dias), as ondas foliculares recomeçam, com a formação de folículos dominantes que falham em ovular devido à baixa frequência de pulsos de LH, em decorrência da diminuição dos estoques desse hormônio na hipófise anterior, que se restabelecem entre 15 e 30 dias pós-parto. O aumento da frequência de pulsos de LH, chegando a intervalos de 12-15 minutos, é fundamental para o desenvolvimento folicular final até o processo de ovulação (GONÇALVES et al., 2010).

Em experimento publicado em 2013, os autores testaram o momento em que os estoques endógenos de LH são repostos, logo após a parição de vacas de corte zebuínas

(Nelore). Eles chegaram à conclusão que os estoques hipofisários de LH, em vacas Nelore, demoram apenas duas semanas (14 dias) para serem repostos, já que, após estímulos induzidos com análogo de GnRH (50 µg de lecirelina), as vacas foram capazes de responder com picos de LH, já nesta fase (BARROS et al., 2013).

No entanto, em decorrência da mamada e do escore de condição corporal (ECC), uma interação entre glicocorticoides, leptina, estradiol-17β e neuro-hormônios (ex: endorfinas e neuropeptídeo Y - NPY) é a principal responsável por inibir os pulsos de GnRH e, consequentemente, de LH durante o pós-parto em bovinos de corte. Com o aumento do intervalo pós-parto, em dependência dos níveis nutricionais, os hormônios que inibem o gerador de pulsos de GnRH começam a diminuir sua atividade e inicia o restabelecimento da frequência de GnRH, permitindo o desenvolvimento folicular final, ovulação e retomada da ciclicidade (YAVAS & WALTON, 2000).

O ECC no momento do parto, o ganho de peso e o balanço energético são os principais fatores envolvidos com o retorno à ciclicidade após o parto. Vacas de corte com baixo ECC na parição, perda de peso e consequente balanço energético negativo nas primeiras semanas após o parto, permanecem por um período mais prolongado na condição de anestro pós-parto (FERREIRA, 1995). As vacas com ECC baixo ao parto têm um intervalo mais longo do parto à primeira ovulação que vacas com ECC alto, sendo associado com a baixa frequência de pulsos de LH e atraso no desenvolvimento de folículos estrogênio-ativos (PINTO ANDRADE et al., 1995). Animais com melhores ECC pré e pós-parto têm um menor intervalo parto/concepção, respondem melhor aos tratamentos hormonais e têm uma estrutura luteal induzida pelo desmame e pelos tratamentos com GnRH mais duradoura (WILLIAMS, 1989).

O ECC na parição é correlacionado positivamente com o desenvolvimento folicular precoce no período pós-parto (RYAN et al., 1994), conteúdo pituitário de LH aos 30 dias pós-parto (CONNOR, et al., 1990), concentrações de IGF-I circulantes e frequência dos pulsos de LH (BISHOP et al., 1994).

3.6. Metabolismo e suas interações na reprodução

O metabolismo basal, a atividade, o crescimento e as reservas básicas de energia têm prioridade aos processos reprodutivos, como o início da ciclicidade e o estabelecimento e manutenção da prenhez (SHORT et al., 1990). O balanço energético negativo reduz a disponibilidade de glicose e aumenta a mobilização de reservas corporais (GRIMARD et al., 1995).

Evidentemente, as variações de ECC estão relacionadas com outros aspectos do indivíduo, como é o caso da amamentação. Existe uma correlação entre o ECC e suas consequências com o efeito inibitorio da amamentação, sendo um fator altamente potencializado pelo outro. Fisiologicamente, no período pós-parto precoce, a diminuição de pulsos de LH é devido à falta desse hormônio no estoque da hipófise anterior e esse fato ocorre independente da amamentação. Após o restabelecimento dos estoques, a diminuição de pulsos de LH é dependente dos efeitos da amamentação. A ação inibitoria da mamada ocorre pela inibição na frequência de GnRH do hipotálamo e consequente supressão na liberação pulsátil de LH. Estudos têm demonstrado que a amamentação suprime o retorno dos pulsos de LH pela estimulação tatil do úbere ou tetos pelo bezerro (WILLIAMS et al., 1987); entretanto, outros fatores como a visão e o olfato também têm ação inibitoria na liberação do LH (GRIFFITH & WILLIAMS, 1996). A presença física do bezerro modula o efeito supressivo da amamentação na ovulação pós-parto, por afetar sinais somatossensoriais (WILLIAMS & GRIFFITH, 1995). Esse efeito é significativamente maior quando as vacas amamentam seu próprio bezerro (LALMAN et al., 1997).

3.7. Técnicas hormonais para incremento dos resultados de programas de IATF

Em inúmeros trabalhos publicados (BARUSELLI et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2006; BARROS et al., 2004) a utilização de protocolos de IATF associados à aplicação da eCG no momento da retirada dos dispositivos de progesterona (8º ou 9º dia na maioria dos protocolos) é a técnica que tem apresentado melhores resultados de prenhez e melhor aplicabilidade prática (manejo mais fácil), quando tratamos vacas de corte lactantes com baixas taxas de ciclicidade.

Nesses trabalhos ficaram comprovados que a suplementação com 300 a 400 UI de eCG fornecem um aporte gonadotrófico ao folículo dominante, capaz de suprir a falta de pulsatilidade de LH, frequentemente observada em vacas em anestro, resultando numa maior taxa de crescimento folicular, numa maior taxa de ovulação ao final do protocolo, numa maior taxa de prenhez e ainda numa maior produção de progesterona pelo corpo luteo resultante do tratamento com a eCG (BARUSELLI et al., 2013).

Esses benefícios acontecem devido às características próprias da eCG. Essa proteína de alto peso molecular extraída do soro de eguas gestantes possui atividades FSH e LH (afinidade por ambos receptores) e possui uma longa vida média sanguínea, ação promovida pela grande quantidade de ácido siálico presente em sua constituição. Essa característica aumenta sobremaneira seu tempo de ação, pois as enzimas normalmente adaptadas a degradar o FSH e o LH não conseguem fazer a degradação da eCG de forma eficiente (BARUSELLI et al., 2013).

De 2008 a 2012, vários trabalhos publicados (MARTINS et al., 2008; SANTOS et al., 2010; FERNANDES et al., 2012), entre outros, obtiveram sucesso utilizando preparações comerciais contendo diferentes proporções de FSH e LH suínos em protocolos de IATF, com taxas de prenhez comparáveis às obtidas com a eCG. Contudo, em outros trabalhos publicados (VASCONCELOS et al., 2009; CREPALDI et al., 2011; NELIO et al., 2012) se contrapõe aos trabalhos anteriores, demonstrando menor eficácia destas preparações de FSH e LH suínos quando comparadas à eCG. Essa variabilidade de resultados leva à uma resistência técnica pelos profissionais à utilização das preparações contendo FSH e LH em programas de IATF.

3.8 Uso de análogo de GnRH para induzir ciclicidade em vacas em anestro

Em trabalho publicado (BISHOP e WETTEMANN, 1993), os autores realizaram restrição alimentar severa em um grupo de vacas de corte, até que houvesse a paralisação total da atividade cíclica (anestro). A partir do anestro constatado, passaram a infundir análogos de GnRH para essas vacas. Eles constataram que a infusão frequente de microdoses de análogo de GnRH (2 µg de gonadorelina/hora), fornecida com auxílio de bomba de microinfusão no subcutâneo das vacas do experimento, aumentava a

liberação de LH, incrementava o crescimento folicular e fazia com que as vacas retomassem a atividade cíclica, em cerca de 10 dias. Contudo, a impossibilidade prática do uso de bombas de infusão automáticas em fêmeas bovinas, bem como seu altíssimo custo, manteve essa alternativa terapêutica esquecida até os dias de hoje.

As preparações comerciais de análogos de GnRH disponíveis no mercado brasileiro utilizam diluentes de base aquosa, garantindo, após aplicação parenteral, uma ação extremamente rápida (poucas horas). Dessa forma, esses produtos somente são usados na indução da ovulação ou na terapia do distúrbio cístico de fêmeas bovinas, não sendo adequados para a promoção de crescimento folicular, do ponto de vista prático (MADUREIRA et al., 2012).

3.9 Novos veículos para aumentar o tempo de ação de proteínas e peptídeos

As pesquisas farmacológicas de novos veículos, capazes de promover uma liberação lenta e gradual de proteínas e peptídeos vêm se desenvolvendo sobremaneira nos últimos anos. Em artigo publicado (MELO, CUNHA JUNIOR e FIALHO, 2012), os autores comentam sobre a eficiência de sistemas poliméricos de liberação controlada, como as micro e nanopartículas e os hidrogéis que já são utilizados em algumas formulações comerciais de algumas proteínas e peptídeos.

Em trabalho publicado (PRISELL, CAMBER, HISELIUS e NORSTEDT, 1992), os autores utilizaram matriz de hialuronato a 1 e 2% como veículo de liberação lenta para a proteína IGF1 e demonstraram que o hialuronato proporciona uma boa eficiência nesse aspecto, resultando em um considerável aumento do tempo de liberação da proteína IGF1 quando comparado a veículos aquosos comuns, sem que nenhum efeito indesejável referente ao hialuronato fosse observado.

O hialuronato, também chamado de ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de alto peso molecular que contém repetidas unidades de N-acetilglucosamina e ácido glicurônico. Ele ocorre naturalmente no líquido sinovial, corpo vítreo ocular, pele e no cordão umbilical. A função *in vivo* do hialuronato é ainda obscura, mas acredita-se que serve como um estabilizador e como um sistema de transporte para nutrientes e metabólitos, por exemplo, no corpo vítreo do globo ocular e no líquido sinovial nas juntas. O hialuronato é rotineiramente usado na clínica e cirurgia ocular, onde a solução

a 1% é comumente usada. Outros efeitos benéficos, resultantes da aplicação local de hialuronato têm sido demonstrados durante a cicatrização de feridas. Desde que o hialuronato é uma substância natural e não irritante, com uma grande capacidade de absorção de água, existe interesse em ser estudado e usado como veículo para liberação local de drogas (HOARE et al., 2007).

Segundo alguns autores, o hialuronato quando hidratado e associado à determinada proteína, forma uma trama semelhante a uma rede, que dificulta mecanicamente a saída da proteína do interior deste complexo, fazendo com que a liberação desta proteína seja de forma bem mais lenta, que se associada a veículos aquosos (MELO; CUNHA JUNIOR e FIALHO, 2012).

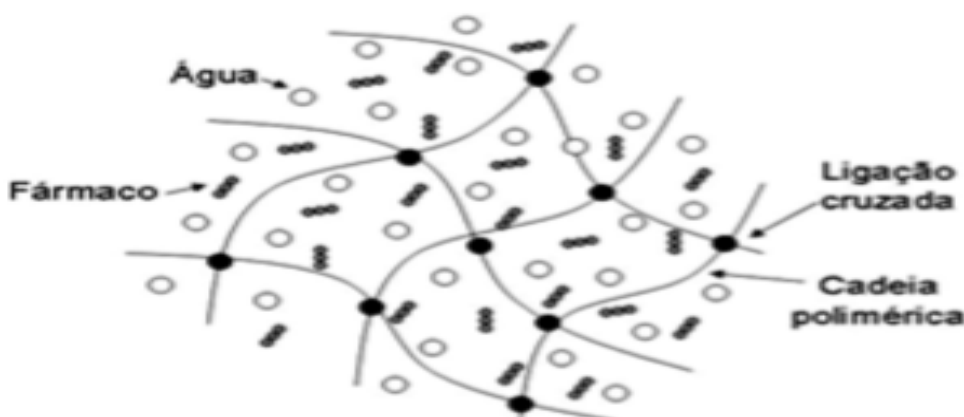


Figura 1: Formação de cadeias entrelaçadas de hialuronato que retém as proteínas em seu interior, proporcionando uma liberação gradual destas.

Em trabalho publicado (BÓ et al., 2011), os autores utilizaram gel de hialuronato a 10 e 20% como veículo de liberação lenta para preparação comercial de FSH e LH (Folltropin-V® - Bioniche, Canadá), obtendo sucesso na superovulação de vacas de corte Red Angus com uma única dose desta preparação por via IM.

Foi observado que a preparação do hialuronato a 20% foi capaz de proporcionar uma liberação controlada do FSH por até 4 dias, enquanto a preparação a 10% manteve os níveis de liberação apenas por 2 a 3 dias.

Tabela 2. Resposta superovulatória de vacas de corte tratadas com 400 mg de FSH, 2 vezes ao dia por 4 dias ou numa injeção associada a veículo de liberação lenta (hialuronato a 20%)

Tratamento	N	CL	Estruturas totais	Fertilizados	Embriões transferíveis	Vacas com 0 embriões transferíveis
Controle (2 x dia)	29	13,7±1,2	12,3±1,5	7,2±1,1	4,9±0,8	3
Injeção única	29	13,8±1,2	13,7±2,1	8,4±1,4	6,4±1,3	4
Valor de P		0,963	0,935	0,648	0,372	0,585

BÓ et al., 2011

4 REFERÊNCIAS

AMSTALDEN, M. et al. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p.1555-1561, Maio 2002.

ANDERSON, L.H.; DAY, M.L. Development of a progestin-bases estrus synchronization program: I- Reproductive response of cows fed melengestrol acetate for 20 days with as injection of progesterone. **Journal Animal Science**, v..76, n. 5, p.1267 - 1272, Maio 1998.

AYRES, H.; MARTINS, C.M.; FERREIRA, R.M. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1 - 4, p.77 - 87, dez. 2008.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 23 - 34, ago. 2004. Suplemento.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L; MARQUES, M.O. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrusbeef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, n.3, p.486-497, jul. 2004.

BARUSELLI, P.S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beefs cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.214, maio 2003. Resumo.

BASTOS, G.M.; et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v.62, p.847-853, jul. 2004.

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

BISHOP, D.K.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **Journal of Animal Science**, v.72, nº 10, p. 2703 - 2708, out. 1994.

BISHOP, D. K. ; WETTEMANN, R. P. Pulsatile infusion of gonadotropin-releasing hormone initiates luteal activity in nutritionally anestrous beef cows. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 71, n.10, p.2714-2720, oct.1993.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinâmica folicular ovárica nos bovinos. In : **Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes**. São Paulo, 2000. p.14-34.

BÓ, G.A et al. Critérios em la eleccion de los programas de IATF em los rodeos para carne. In: JORNADAS TAURUS, 2002.

BÓ, G.A. et al. Implementacion de programas de inseminacion artificial em rodeos de cria de Argentina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 5, 2005, Córdoba. **Anais...** Córdoba, 2005, p. 97 – 128.

CACHAPUZ, J. M. A. O setor primário no Rio Grande do Sul: diagnóstico e perspectivas sócio-econômicas. **Pecuária de Corte nos Anos 80**, Porto Alegre, p.17 - 39, 1991.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-B based, fixed time AI in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855 - 865, set. 2003.

COMINGS, D.E.; et al. Genetic variants of the human obesity (OB) gene: Association with body mass index in young women, psychiatric symptoms, and interaction with the dopamine D-2 receptor (DRD2) gene. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v.1, n. 4, p.325 - 335, set. 1996.

COMINGS, D.E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v.3, n. 1, p. 21 – 31, jan. 1998.

CONNOR, H.C. et al. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, n. 3, p.403 - 411, jul. 1990.

CUPP, A.S. et al. Secretion of gonadotrophins change the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding change in progesterone or 17 β -oestradiol. **Animal Reprod. Sci.**, v. 37, n. 2, p. 109 - 119, jan. 1995.

ERENO, R. L.; et al. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n.5, p. 1288 - 1294, set/out. 2007.

EVANS, A.C.O.; FORTUNE, J.E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinol.** v.138, n. 7, p.2963 - 2971, jul. 1997.

FERREIRA, A.M. Novos conceitos sobre o anestro pós-parto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1994, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.62.

FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p.648 - 654, set. 2001.

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**: T. 1725. São Paulo: FMVZ-USP, 2006.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPE, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, nº 3, p.187 - 200, set. 1989.

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrinology Review**, v.13, n.4, p.641 - 649, nov. 1992.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Anestro pós-parto em vacas de corte: revisão bibliográfica. **Boletim da Universidade Federal de Santa Maria**: Departamento de Clínica de Grandes Animais, 2009.

GRIFFITH, M.K.; WILLIAMS, G.L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 54, nº 4, p.761 - 768, abr. 1996.

GRIMARD, B. et al. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, n. 1, p.173 – 179, maio 1995.

KASTELIC, J.P., KNOPE, L., GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandine F2 treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 54, n. 3, p.169 - 180, abr. 1990.

LALMAN, D.L. et al. Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 78, p.530 - 538, jan. 1997.

LOOPER, M.L.; LENTS, C.A.; WETTEMANN, R.P. Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora luteal in postpartum beef cows. **Journal Animal Science**, v. 81, n. 10, p. 2390 - 2394, out. 2003.

MACIEL, M.N. et al. Leptin Prevents Fasting-Mediated Reductions in Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone and Enhances Its Gonadotropin-Releasing Hormone-Mediated Release in Heifers. **Biology of Reproduction**, v.70, n. 1, p. 229 - 235, jan. 2004.

MADUREIRA, E. H. et al. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina, 2006, p. 63 – 70.

MAFFEI, M. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, v.1, n. 3, p.1155 - 1161, jan. 1995.

MANN, G.E Progesterone and Fertility. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA 2, 2006, Londrina **Anais...** Londrina, 2006. p. 85 – 92.

MANTOVANI, A.P.; BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A. Aumento das dimensões do folículo dominante e do corpo lúteo, da concentração plasmática de progesterona e da taxa de aproveitamento de receptoras de embrião bovino sincronizadas com CIDR-B por tempo prolongado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 7, n. 2, p. 91 – 96, abr/jun. 2010.

MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; ADAMS, G.P. Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008. **Anais...** Londrina, 2008, p. 15 – 25.

MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Control of ovarium function for assisted reproductive and technologies in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.6, n.1, p.114 – 124, out., 2009.

MARQUES, M.O.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção ou do eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. In: REUNIÃO SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2005, Barra Bonita. **Anais...** Barra Bonita, SBTE, 2005.

MARTIN, G.B. et al. Interaction between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, n. 1, p.319 – 328, fev. 1988.

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

MONGET, P. et al. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Hormone Research**, v.45, n.2, p.211 - 217, mar. 1996.

MORAES, J.C.F. **Anestro e fertilidade pós-parto em bovinos de corte: avanços na reprodução bovina.** Pelotas: UFPel, 1999. Cap. 2, p.25.

NEVES, K. A. L. **Efeito do intervalo entre a inseminação e ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado:** T2341 São Paulo: FMVZ-USP, 2010.

NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 2, p.99 - 105, jan/jun. 1999.

OLIVEIRA, J.F.C.; HENKES, L.E. **Marcadores moleculares em reprodução animal: biotécnicas aplicadas à reprodução bovina.** São Paulo: Varela, 2002. p. 210-261.

OLIVEIRA, J.F.C. et al. Association between reproductive traits and four microsatellites in brangus-ibagé cattle. **Genetics and molecular biology**, São Paulo, v. 28, n.1, p. 54-59, 2005.

PADMANABHAN, V.; MCNEILLY, A. Is there an FSH-releasing factor? **Animal Reproduction**, v.121, n. 1, p.21 - 30, jan. 2001.

PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior and estrus-to ovulation interval in Nelore cattle (*Bos Indicus*) with natural estrus, or estrus induced with prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, n. 3, p. 667 - 681, set. 1998.

PINTO A.L. et al. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 40, n. 3, p.177 - 192, nov. 1995.

RYAN, D.P. et al. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. **Domestic Animal Endocrinology**, v.11, n. 2, p.161 -174, abr. 1994.

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v.65, n. 1, p.112 - 118, jul. 2001.

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

RHODES, F.M. et al. Treatment of cows with a postpartum anestrous interval. **Journal Animal Science**, v. 86, n. 6, p. 1876 - 1894, jun. 2003.

SÁ FILHO, M. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos Indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, n. 3, p. 455 - 463, ago. 2010.

SÁ FILHO, M. F. et al. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.79, n. 4, p. 625 - 632, mar. 2013.

SÁ FILHO, M. F. et al. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed-time artificial insemination. In: ISABR – INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2, 2008, São Paulo. **Anais...** Paraná, 2008.

SANTOS, J.E.P., AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, p. 19-89, 1998.

SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, 2006, Londrina. **Anais...** Londrina, 2006, p. 30 – 54.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, n. 5, p.1403 - 1409, nov. 2001.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n. 1-2, p.53 - 65, jul. 2002.

SCHOENAU, W. **Polimorfismos nos genes do receptor do IGF-I e da leptina na espécie bovina e sua associação com produção e reprodução**. 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

SCHROTH, G.P.; CHOU, P.J.; HO, P.S. Mapping Z-DNA in the human genome: computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.17, p.11846-11855, jul. 1992.

SENEDA, M.M. et al. Foliculogênese em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, 3, 2008. **Anais...** Londrina, 2008, p.6-14.

SHORT, R.E. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.68, n. 3, p.799 - 816, abr. 1990.

SILVA, R.C.P. et al. Efeito do eCG e do GnRH na taxa de prenhez de vacas Nelores lactantes inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 32, p. 221, 2004. Suplemento.

SILVEIRA, R.S. et al. Sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (sistema BioRep) com diferentes doses de eCG para vacas de corte no pós-parto. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2004. 1 CD-ROM.

SILVEIRA, R.S. et al. Proposta de um novo sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (Sistema BioRep) em comparação com sistemas de desmame definitivo e temporário para vacas de corte no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n. 3, p.590 - 591, ago. 2003.

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

STRAUCH, T.A et al. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.1, p.1363 - 1370, jun. 2003.

SUNE, J.F.V. et al. Inseminação artificial em gado de corte durante dez dias utilizando uma minidose de prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.9, n. 3, p.141 - 145, ago. 1985.

TRÍBULO, A. et al. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin V, **An. Reprod. Scie.** v.129, p. 7 -13, 2011.

WILLIAMS, G.L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v. 67, p.785, 1989.

WILLIAMS, G.L. et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, nº 1, p.339 - 349, Mar. 2002.

WILLIAMS, G.L.; GRIFFITH, M.K. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, n. 1, p.463 - 475, jan. 1995.

WILLIAMS, G.L et al. The postweaning rise of tonic luteinizing hormone secretion in anestrus cows is not prevented by chronic milking or the physical presence of the calf. **Biology of Reproduction**, v.36, n. 1, p.1079 – 1084, ago. 1987.

VASCONCELOS, J.L.M. Controle do estro e da ovulação visando à inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000, p.115-157

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

ZIEBA, D.A. et al. Regulatory Roles of Leptin at the Hypothalamic-Hypophyseal Axis Before and After Sexual Maturation in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.71, n. 3, p. 804 – 812, set. 2004.

Capítulo 2

GnRH em veículo de liberação lenta para indução de crescimento folicular em vacas em anestro

Autores: Leandro Francisco Gofert ⁽¹⁾, Renato Valentim ⁽²⁾, Carlos Antonio de Carvalho Fernandes ⁽³⁾, Jairo Pereira Neves ⁽⁴⁾ Fabiana Cristina Varago ⁽⁵⁾,

Endereços institucionais e eletrônicos:

⁽¹⁾ Aluno de mestrado, ^(3,4,5) Prof. Dr. na Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Rod. MG 179, Km 0, Campus Universitário, Alfenas/MG, CEP: 37130-000.

E-mail: lfg1968@hotmail.com; carlos@biotran.com.br; jpneves@terra.com.br; varagovet@hotmail.com

⁽²⁾ Doutor pela FMVZ-USP e proprietário de Laboratório Grascon Ltda., Rua Emilio de Sousa Docca, 474, Vila Santa Catarina, São Paulo/SP, CEP 04379-024.

E-mail: renato@grascon.com.br

Resumo - O crescimento folicular induzido por gonadorelina (Fertagyl[®], MSD, Brasil) associada a ácido hialurônico a 20% (AH20) foi avaliado em vinte e sete vacas em anestro como descrito: Dia 0 - dispositivo intravaginal (Primer[®], Tecnopec, Brasil) + 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®], Tecnopec, Brasil); D8 – remoção dos dispositivos, aplicação de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin[®] - MSD, Brasil) e divisão de lotes: G100 (100 µg de gonadorelina + AH20), G200 (200 µg de

gonadorelina + AH20) e grupo controle (GC - 2 ml de solução fisiológica); D9 - 1 mg de benzoato de estradiol; D10 - inseminação artificial. Ultrassonografias foram realizadas nos dias 8, 9 e 10 (mensuração folicular), 19 (ovulação) e 44 (gestação). O crescimento folicular entre o dia 8 e 9 não diferiu entre os grupos: 1,9 mm (G100), 1,4 mm (G200) e 1,8 mm (GC) assim como a taxa de ovulação: 100% (G100), 77,8% (G200), 77,8% (GC), contudo, os animais tratados anteciparam a ovulação. A taxa de prenhez foi superior no GC - 33,4% contra 0% nos grupos tratados. A associação gonadorelina + hialuronato 20% não aumentou o crescimento folicular, nem a taxa de ovulação e possivelmente induziu pico precoce de LH prejudicando os resultados dos animais tratados.

Termos para indexação: Hialuronato, inseminação, protocolo, ovulação, vacas.

GnRH in slow release vehicle for follicular growth induction in anestrus cows –

Follicular growth induced by gonadorelin (Fertagyl[®], MSD, Brazil) associated with 20% hyaluronic acid (AH20) was evaluated in twenty-seven cows in anestrus as described: Day 0 - intravaginal device (Primer[®], Tecnopec, Brazil) + 2 mg of estradiol benzoate (RIC-BE[®], Tecnopec, Brazil); D8 - removal of devices, application of 500 µg of sodium cloprostenol (Ciosin[®] - MSD, Brazil) and lots of division: G100 (100 µg of gonadorelin + AH20), G200 (200 µg of gonadorelin + AH20) and control group (CG - 2 ml saline); D9 - 1 mg estradiol benzoate; D10 - artificial insemination. Ultrasound were performed on days 8, 9 and 10 (follicular measurement), 19 (ovulation) and 44 (pregnancy). Follicular growth between day 8 and 9 did not differ between groups: 1.9 mm (G100), 1.4 mm (G200) and 1.8 mm (GC) and ovulation rate: 100% (G100) , 77.8% (G200), 77.8% (GC), however, animals treated anticipated ovulation. The

pregnancy rate was higher in GC - 33.4% versus 0% in the treated groups. The association gonadorelin + 20% hyaluronate did not increase follicular growth or ovulation rate and possibly induced premature LH surge damaging results of treated animals.

Index terms: Cows, follicle, FTAI, hialuronate.

Introdução

O mercado brasileiro da Inseminação artificial em bovinos vem apresentando crescimento considerável nos últimos 5 anos, principalmente pela disseminação dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Essa tecnologia cuja aplicação a campo começou por volta de 15 anos, hoje em dia, é responsável por cerca de 60% da demanda por doses de sêmen comercializadas no Brasil, segundo relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2013).

Um dos desafios ao se utilizar essa tecnologia a campo está nas condições ambientais e nutricionais às quais a grande maioria dos rebanhos bovinos brasileiros é submetida. Ambientes tropicais com pastagens de baixa qualidade não atendem plenamente as necessidades nutricionais, principalmente de vacas recém paridas, fase na qual a demanda energética e protéica é bastante acentuada pela amamentação. Além disso, é notório que vacas zebuínas (grande maioria do rebanho brasileiro) são mais tardias na retomada da ciclicidade pós-parto, quando comparadas a vacas taurinas (Santos & Sá Filho, 2006).

Dessa forma, é comum que as vacas demorem a apresentar atividade cíclica após o parto, o que faz com que os protocolos de IATF sejam frequentemente aplicados em rebanhos com altas taxas de anestro.

Este desafio vem sendo superado através da adição de hormônios que auxiliam a fase final do crescimento folicular das fêmeas em anestro, como a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Vários trabalhos demonstram que a aplicação de protocolos de IATF sem a utilização de indutores de crescimento folicular apresenta resultados inconsistentes em vacas de corte lactantes, enquanto protocolos associando eCG ou FSH conseguem resultados mais consistentes (Baruselli et al., 2003 & Santos et al., 2006).

Os indutores de crescimento promovem um encarecimento considerável da técnica, pois representam porcentagem vultosa do custo de um protocolo no mercado brasileiro.

Logo, a obtenção de alternativas a estes produtos, que sejam viáveis do ponto de vista econômico podem gerar benefícios evidentes à pecuária nacional, tanto para criadores como para os técnicos.

Nesse trabalho buscou-se avaliar se a aplicação de GnRH associada a um veículo que pudesse proporcionar a liberação lenta e prolongada deste peptídeo poderia aumentar as taxas de crescimento folicular, taxas de ovulação e de prenhez em programas de IATF aplicados à vacas de corte lactantes em anestro.

Material e métodos

Foram utilizadas vacas de corte zebuínas, da raça Nelore, criadas a pasto, com período pós parto entre 30 a 60 dias, lactantes e com escore de condição corporal 2,5 (numa

escala de 1 a 5, definida por Lowman et al., 1976). As vacas foram mantidas em pastagens de *Brachiaria decumbens*, com mineralização e água *ad libitum*, na Fazenda Vitória, no município de Alfenas, estado de Minas Gerais. O experimento foi realizado entre os meses de Novembro de 2014 a Janeiro de 2015.

No dia 0 do experimento 120 vacas foram avaliadas por ultrassonografia (C40 Vet - Landwind – China). No total foram selecionadas 32 fêmeas com úteros plenamente involuídos e ovários sem sinais de atividade luteal cíclica, caracterizando condição de anestro (ausência de corpo lúteo) e presença de folículos com diâmetros inferiores a 8 mm. Optou-se por animais nesta situação reprodutiva (vacas em anestro), para se evitar a pulsatilidade endógena de LH.

Após a seleção dos 32 animais para o experimento, estes foram agrupados em apenas um lote de tratamento inicial. Todos receberam no dia 0 do experimento um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (Primer[®], Tecnopec, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (RIC-BE[®], Tecnopec, Brasil), após esse procedimento as vacas retornaram ao pasto, ficando lá alojadas por 8 dias.

No dia 7 do experimento, no período da tarde, as preparações contendo gonadorelina associada ao hialuronato foram manipuladas no laboratório Biotran, localizado em Alfenas – MG.

Tomou-se de dois frascos de vidro âmbar, limpos e esterilizados em estufa a 150° C, com capacidade para 60 ml e tampa plástica hermética. O ácido hialurônico puro em pó foi comprado de Sinochen Jiagsu Co. Ltda. – China, de especificação farmacêutica, para uso injetável.

Colocou-se em cada um dos frascos 480 mg de ácido hialurônico em pó, devidamente aferidos em balança de alta precisão. No primeiro frasco, destinado ao G100, adicionou-

se às 480 mg de hialuronato, 12 ml de Fertagyl[®] (100 µg de gonadorelina por ml) e 12 ml de solução fisiológica estéril. O frasco foi agitado por alguns minutos e deixado em descanso até a homogeneização da solução. Este preparado continha por dose de 2 ml: 100 µg de gonadorelina, 40 mg de ácido hialurônico e veículo q.s.p. (solução fisiológica). Ao final da diluição o frasco foi hermeticamente fechado.

No segundo frasco, destinado ao G200 de vacas, adicionou-se às 480 mg de hialuronato, 24 ml de Fertagyl[®] (100 µg de gonadorelina por ml). O frasco foi agitado mecanicamente por alguns minutos e deixado em descanso até a homogeneização da solução. Ao final este preparado continha por dose de 2 ml: 200 µg de gonadorelina e 40 mg de ácido hialurônico. Ao final da diluição o frasco foi hermeticamente fechado.

Ambos os preparados foram armazenados em local refrigerado (8°C) até o dia seguinte.

No dia 8, usando-se seringas estéreis de 3 ml acopladas a agulhas 40 x 12, foram aspiradas doses de 2 ml de cada solução preparada, as doses foram identificadas e transportadas até o curral em caixa térmica, permanecendo ali até o momento da aplicação nos animais.

Nesse mesmo dia às 8h, o lote de 32 vacas foi novamente trazido ao curral. Todas foram examinadas ultrassonograficamente, verificando-se o status folicular de cada animal, principalmente relacionado ao diâmetro do maior folículo. Das 32 vacas que iniciaram o experimento, uma morreu e 4 vacas perderam o dispositivo intravaginal de progesterona em momento não conhecido, sendo então retiradas do experimento, restando 27 vacas.

As 27 vacas foram separadas em 3 lotes de tratamento com 9 animais cada, quando se tentou homogeneizar os lotes quanto ao diâmetro folicular, de forma que cada grupo recebesse animais com folículos dominantes de diâmetros equivalentes, a fim de não se favorecer nenhum dos grupos experimentais, pois é sabido que vacas com maiores

diâmetros foliculares na retirada dos dispositivos apresentam maior chance de ovular e emprenhar que vacas que apresentem folículos pequenos nessa ocasião (Gimenez et al., 2006).

Após a divisão dos grupos procedeu-se o seguinte manejo:

- Grupo controle (GC - 9 animais): remoção dos dispositivos intravaginais, aplicação de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin[®], MSD, Brasil) IM e 2 ml de solução fisiológica estéril (placebo) IM.
- G100 (9 animais): remoção dos dispositivos intravaginais, aplicação de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin[®], MSD, Brasil) IM e 2 ml da formulação contendo 100 µg de gonadorelina (Fertagyl[®], MSD, Brasil) associada ao ácido hialurônico formando uma solução de concentração final a 20% por via IM.
- G200 (9 animais): Mesmo tratamento do G100, porém com 200 µg de gonadorelina.

Após as aplicações e exames, os 3 lotes retornaram ao pasto. A opção pelo ácido hialurônico a 20% foi baseada em trabalhos anteriores com esse diluente que, quando associado ao FSH, demonstrou ser capaz de liberar essa proteína de forma bastante lenta por períodos de 4 dias (Bó et al., 2011). A opção pelas doses de 100 e 200 µg de gonadorelina está fundamentada em dois princípios básicos.

Viabilidade econômica do processo (doses superiores a 200 µg apresentariam custos superiores às técnicas já consagradas).

Em trabalho publicado em 1993, os autores conseguiram induzir ciclicidade em vacas em anestro infundindo 2 µg de gonadorelina/hora (Bishop e Wettemann, 1993). Da retirada dos dispositivos (d8) até o pico estimado de LH, no protocolo IATF trabalhado no experimento, necessita-se de suporte gonadotrófico de 48 horas (48h x 2µg = 96 µg).

A dose de 100 μg estaria de acordo com esse trabalho e a dose de 200 μg seria o dobro da observada pelos autores. Porém, como a dinâmica de liberação do hialuronato é pouco conhecida, optou-se por essas duas doses.

No dia 9 do experimento, às 8h, os 3 lotes foram submetidos a exames ultrassonográficos, quando tiveram seus folículos dominantes mensurados, para determinar a taxa de crescimento dos mesmos. Todas as vacas receberam nesse momento 1 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®], Tecnopec, Brasil) como indutor de ovulação e, após o término do manejo, voltaram ao pasto.

No dia 10 do experimento, às 14h, os 3 lotes foram examinados através de ultrassonografia, quando tiveram seus folículos dominantes mensurados, para determinar a taxa de crescimento destes. Todas as vacas, logo após o exame ultrassonográfico, foram inseminadas artificialmente com sêmen de um mesmo touro e em seguida retornaram ao pasto.

No dia 19 do experimento (9 dias após as inseminações), as vacas dos 3 lotes foram examinadas por ultrassonografia para se determinar a presença de CL, que confirma a ovulação, permitindo a mensuração da taxa de ovulação de cada tratamento utilizado.

Quarenta e quatro dias após o início do experimento, as vacas dos 3 lotes foram examinadas através de ultrassonografia, para se determinar a presença ou não de gestação, gerada pelos tratamentos efetuados.

Os dados quantitativos como: diâmetros foliculares nos dias 0, 8, 9 e 10; taxas de crescimento folicular do D8 ao D9; bem como os diâmetros dos corpos lúteos foram comparados por Análise de Variância, método dos quadrados mínimos, para isso se utilizou o programa estatístico MINITAB. O modelo matemático testou o efeito dos tratamentos sobre as medidas de diâmetro folicular nos referidos dias.

Os dados qualitativos de presença de CL no dia 19 (taxa de ovulação estimada), a taxa de antecipação da ovulação e taxa de prenhez foram analisados pelo teste Qui-quadrado.

Resultados e Discussões

Os dados do diâmetro folicular médio dos animais do grupo controle (GC), GnRH 100 (G100) e GnRH 200 (G200) nos D0, D8, D9 e D10 encontram-se expressos abaixo na tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão do diâmetro do folículo dominante observado nos intervalos para os três grupos experimentais.

	Ø Fol. médio D0 (mm)	Ø Fol. médio D8 (mm)	Ø Fol. médio D9 (mm)	Ø Fol. médio D10 (mm)	Tx. de crescimento D8 ao D9 (mm)	Tx. de crescimento D9 ao D10 (mm)
G100	5,24±1,16 ^a	7,33±1,83 ^b	9,20±1,69 ^c	-	1,87 ^d	-
G200	5,86±1,45 ^a	8,20±1,67 ^b	9,57±1,55 ^c	-	1,37 ^d	-
GC	5,18±1,55 ^a	7,43±1,60 ^b	9,23±1,18 ^c	9,73±1,58	1,80 ^d	0,5

Legendas: Ø significa diâmetro; Tx. significa taxa.

Não houve diferença ($p \leq 0,05$) quando se comparou os diâmetros foliculares nos dias 0 ($p=0,23$), 8 ($p=0,75$), 9 ($p=0,095$) e 10 ($p=0,90$). Houve uma tendência de diferença entre os diâmetros foliculares no dia 9.

Uma vez que não foram encontradas diferenças entre a taxa de crescimento dos folículos nos três grupos, é possível concluir que as duas formulações testadas (100 µg gonadorelina + hialuronato a 20% e 200 µg gonadorelina + hialuronato a 20%) não

foram capazes de aumentar a taxa de crescimento folicular nas vacas tratadas, quando comparadas ao grupo controle.

A ausência dos efeitos esperados nos grupos tratados pode ser devido ao fato do diluente não ter sido capaz de reter e promover uma liberação lenta da gonadorelina, desta forma, tendo esta sido liberada rapidamente, não conseguiu atingir os objetivos propostos (crescimento folicular).

Um fato relevante a destacar é que não foi possível mensurar os folículos no D10 do G100 e G200, pois ao exame ultrassonográfico, onde havia no D9 o folículo dominante, no D10 a arquitetura folicular desses dois grupos não estava mais caracterizada, sendo que alguns animais já apresentavam inclusive corpos hemorrágicos. Esse fato confirma a liberação rápida da gonadorelina, pois evidencia um pico precoce de LH, que promoveu a ovulação dos animais tratados, fato que não foi observado no grupo controle.

Dessa forma, também não foi possível estabelecer a taxa de crescimento médio folicular entre o D9 e o D10 para os grupos G100 e G200.

No dia 19, após exame ultrassonográfico, foi identificado a estrutura luteal (CL) e foi mensurado o tamanho desta estrutura (quando presente). A taxa de prenhez, mensurada por ultrassonografia no dia 44 do experimento, estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Taxa de ovulação, taxa de ovulação antecipada, tamanho dos CLs e taxa de prenhez observada nos 3 grupos experimentais.

	Tx. de ovulação	Tx. de ovulação antecipada	Tamanhos dos CL (d19)	Tx. de prenhez
G100	100% (9/9) ^a	100% (9/9) ^b	1,56±0,24 ^d	0% (0/9) ^e
G200	77,8% (7/9) ^a	77,8% (7/9) ^b	1,68±0,40 ^d	0% (0/9) ^e
GC	77,8% (7/9) ^a	0% (0/9) ^c	1,51±0,30 ^d	33,4% (3/9) ^f

Em relação à presença de CL no dia 19 (estimativa da taxa de ovulação) não se observou diferença entre o grupo controle e os grupos GnRH 100 ($p=0,13$) e GnRH 200 ($p=1,00$), entretanto a taxa de ovulação antecipada (antes de 54h pós retirada dos dispositivos) foi superior para os grupos tratados GnRH 100 ($p=0,001$) e GnRH 200 ($p=0,004$) com relação ao grupo controle. Não foi observada diferença entre o tamanho dos corpos lúteos dos grupos G100, G200, e GC ($p=0,59$).

Em relação à taxa de prenhez observou-se diferença entre o grupo controle e os grupos tratados ($p=0,057$).

Os dados sugerem que as duas preparações testadas (com 100 e 200 μg de gonadorelina) não foram capazes de aumentar a taxa de crescimento folicular nas vacas tratadas quando comparadas ao grupo controle.

A antecipação das ovulações observada nos animais tratados demonstrou que a associação entre gonadorelina e hialuronato promoveu um pico de LH precoce que culminou muito mais em ovulação do que em crescimento folicular, levando-se a crer que a velocidade com que o análogo de GnRH foi liberado do hialuronato foi muito mais rápida e aguda do que se esperava inicialmente.

Um pico de GnRH eleva a concentração de LH na circulação periférica dentro de 2 a 4h (Twagiramungu et al., 1995). O GnRH promove a ovulação ou a luteinização do folículo dominante se este estiver em sua fase de crescimento ou no início de sua fase estática (Martinez et al., 1997).

Esses dados se contrapõem ao relatado anteriormente (Bó et al., 2011), quando foi observado que o hialuronato a 20% foi capaz de promover uma liberação lenta do FSH, que durou por 4 dias. A enorme diferença de tamanho e peso molecular existente entre o FSH (210 aminoácidos) e a gonadorelina (10 aminoácidos) pode ser a explicação para a liberação mais rápida do análogo de GnRH.

O hialuronato forma cadeias longas de moléculas que formam uma rede que impede que as proteínas saiam do interior dessa trama de forma rápida (Prisell et al., 1992). Porém, no caso de peptídeos pequenos como a gonadorelina, talvez isso não tenha ocorrido de forma eficiente.

Os dados também demonstram que os animais tratados (G100 e G200) não tiveram aumento da taxa de ovulação (verificada pela presença de CL 9 dias pós IA). Isso se explica pelo fato que, ao induzir a ovulação precocemente, logo após a retirada dos dispositivos de progesterona, os folículos não tiveram tempo suficiente para crescer.

Em trabalho publicado em 2006 (Gimenez et al., 2006), folículos de menor tamanho apresentaram menores taxas de ovulação, quando comparados a folículos maiores.

As antecipações das ovulações foi observada em quase todas as vacas que receberam gonadorelina associada ao hialuronato, o que demonstra que essa associação não foi capaz de reter o análogo de GnRH e promover uma liberação lenta deste, não sendo, portanto, capaz de simular a pulsatilidade basal de GnRH – LH observada em vacas cíclicas, da divergência até a pré-ovulação (Gonçalves et al., 2010).

Os dados demonstram que a antecipação das ovulações prejudicou os resultados de prenhez dos grupos tratados, pois quando as vacas foram inseminadas (54 a 56 horas após a retirada dos dispositivos) as ovulações já haviam ocorrido. Como é esperada, a inseminação de vacas já ovuladas não resultou em prenhez. Segundo trabalhos anteriores (Brackett et al., 1980) a fertilidade do oócito cai abruptamente 6 horas pós ovulação, não conseguindo esperar o tempo necessário para a subida e capacitação dos espermatozóides presentes no sêmen, evento que demora entre 6 a 8 horas (Thibault, 1973; Wilmut & Hunter, 1984; Hawk, 1987).

Conclusões

Concluí-se que a associação gonadorelina e hialuronato a 20% nas doses testadas foi ineficiente em promover crescimento folicular, não incrementou a taxa de ovulação e nem resultou em aumento da taxa de prenhez em vacas acíclicas quando comparado ao grupo controle.

Novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de desenvolver um novo diluente para associação com o análogo de GnRH, diluente este que permita uma liberação mais lenta desse hormônio, a fim de testar-se a hipótese inicial.

Referências

AYRES, H.; MARTINSS, C.M.; FERREIRA, R.M. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.77 - 87, 2008.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 23 – 34, 2004.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L; MARQUES, M.O. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82 - 83, p. 486 - 497, 2004.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O. ; NASSER, L.F. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beefs cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, p. 214, 2003.

BASTOS, G.M.; BRENNER, R.H.; WILLKE, F.W.; NEVES, J.P.; OLIVEIRA, J.F.C.; BRAGANÇA, J.F.M.; MACHADO, S.A.; PORCIÚNCULA, P.M.; GONÇALVES, P.B.D. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v.62, p.847-853, 2004.

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

BISHOP, D. K. ; WETTEMANN, R. P. **Pulsatile infusion of gonadotropin-releasing hormone initiates luteal activity in nutritionally anestrus beef cows.** Oklahoma. Animal Science Department, Oklahoma Agricultural Experiment Station, Stillwater 74078-0425, 1993.

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; CHESTA, P. et al. Implementacion de programas de inseminacion artificial em rodeos de cria de Argentina. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 6, 2004, Córdoba. **Anais**. Córdoba, 2005, p. 97 – 128.

ERENO, R. L.; BARREIROS, T.R.R.; SENEDA, M. M. ; BARUSELLI, P.S.; PEROGER, M.F.; BARROS, C.M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezerros ou aplicação de gonadotrofina coriônica eqüina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1288-1294, 2007.

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**, T. 1725 . São Paulo : FMVZ-USP, 2006.

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

GONÇALVES, P. B. D.; DE OLIVEIRA, J. F. C.; DA SILVEIRA, R.S.; FERREIRA, R. Anestro pós-parto em vacas de corte : revisão bibliográfica . **Boletim da Universidade Federal de Santa Maria**: Departamento de Clínica de Grandes Animais, 2009.

MACIEL, M.N.; ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.H.; NEVES, J.P.; WILLIAMS, G.L. Leptin Prevents Fasting-Mediated Reductions in Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone and Enhances Its Gonadotropin-Releasing Hormone-Mediated Release in Heifers. **Biology of Reproduction**, v.70, p.229 - 235, 2004.

MADUREIRA, E. H.; FERNANDES, R.H.R.; ROSSA, L.A.F. et al. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, 2006, Londrina. **Anais**. Londrina, 2006. p. 63 –70.

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

NEVES, K. A. L. **Efeito do intervalo entre a inseminação e ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado:** T.2341 São Paulo: FMVZ-USP, 2010.

OLIVEIRA, J.F.C. et al. Association between reproductive traits and four microsatellites in brangus-ibagé cattle. **Genetics and molecular biology**, São Paulo, v. 28, n.1, p. 54-59, 2005.

PADMANABHAN, V.; MCNEILLY, A. Is there an FSH-releasing factor? **Animal Reproduction**, v.121, p.21 - 30, 2001.

PINTO ANDRADE, L.; RHIND, S.M.; WRIGHT, I.A.; MCMILLEN, S.R.; GODDARD, P.J.; BRAMLEY, T.A. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.40, p.177 - 192, 1995.

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

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

SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. et al. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed- time artificial insemination. In : INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY REPRODUCTION, 2008.

SANTOS, I.C.C., MARTINS, C.M., VALENTIM, R., BARUSELLI, P.S. Pregnancy rate in FTAI anestrous *Bos indicus* cows treated with a single dose of FSHp (Folltropin). **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p.1151, 2007.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.1403 - 1409, 2001.

SILVEIRA, R.S.; et al. Proposta de um novo sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (Sistema BioRep) em comparação com sistemas de desmame definitivo e temporário para vacas de corte no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p. 590 - 591, 2003.

TRÍBULO, A.; ROGAN, D.; TRÍBULO, H.; TRÍBULO, R.; ALASINO, R. V.; BELTRAMO, D.; BIANCO, I.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin V. **An. Reprod. Scie**, v. 129, p. 7 - 13, 2011.

WILLIAMS, G.L.; GRIFFITH, M.K. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 463 - 475, 1995.

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