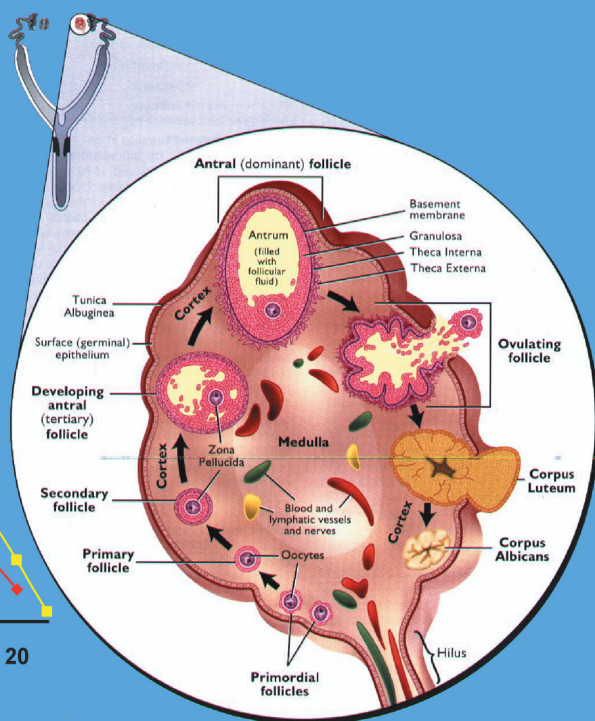
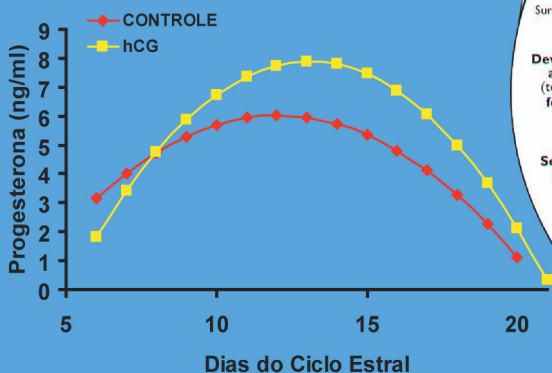


Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos: I. Alternativas farmacológicas para otimizar a função luteínica de vacas de corte

corpo lúteo do ovário



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 26

Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos: I. Alternativas farmacológicas para otimizar a função luteínica de vacas de corte

Rui Machado
Marco Aurélio C. M. Bergamaschi
Ricardo Alamino Figueiredo
Mario Binelli

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
13560 970, São Carlos, SP
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3411- 5600
Fax: (16): 3361-5754
Home page: www.cppse.embrapa.br
Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ana Rita de Araujo Nogueira
Secretária-Executiva: Maria Luiza F. Nicodemo
Membros: Ane Lisy F.G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,
Milena Ambrosio Telles, Sônia Borges de Alencar

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa: <<http://www.drostproject.org/thevisualguideforbovinereproduction> >
Senger, P. Pathways to Pathways to Pregnancy and Parturition, 2ed. 2006.
Rui Machado

1ª edição

1ª edição on-line (2010)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pecuária Sudeste**

Machado, Rui

Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos. I. Alternativas farmacológicas para otimizar a função luteínica de vacas de corte [Recurso eletrônico] / Rui Machado [et al.] __ Dados eletrônicos. __ São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2010.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: Word Wide Web: <<http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Boletim26.pdf> >

Título da página na Web (acesso em 30 de dezembro de 2010).

32 p. (Embrapa Pecuária Sudeste / Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 26; ISSN: 1980-6841).

1. Bovinos - Mortalidade - embrião - I. Bergamaschi, Marco Aurélio C.M. II. Figueiredo, Ricardo Alamino. III. Binelli, Mario. IV. V. Título. VI. Série.

CDD: 636.0824

© Embrapa 2010

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Revisão de Literatura	9
Material e Métodos	11
Resultados	15
Discussão	20
Conclusões	26
Referências	27

Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos: I. Alternativas farmacológicas para otimizar a função luteínica de vacas de corte

Rui Machado¹

Marco Aurélio C. M. Bergamaschi²

Ricardo Alamino Figueiredo³

Mario Binelli⁴

Resumo

A mortalidade embrionária precoce é a maior causa de perdas reprodutivas em bovinos europeus criados no hemisfério norte. Uma vez que a eficiência reprodutiva do gado de corte nacional é baixa, conjectura-se que tais perdas também ocorram com bovinos de corte zebu criados no Brasil. Para aprofundar os conhecimentos sobre esse tema e propor possíveis estratégias que minimizem as perdas de prenhez, foi desenvolvido na Embrapa Pecuária Sudeste o projeto “Mortalidade embrionária em bovinos e estratégias para a sua redução” que, além de ter como objetivo principal a determinação das taxas e da cronologia das perdas reprodutivas em vacas nelore inseminadas artificialmente, estabeleceu como meta o desenvolvimento de uma alternativa farmacológica de otimização da função luteínica de vacas de corte. Para tanto, avaliou-se o efeito de diferentes protocolos de suporte hormonal sobre as funções luteínicas e foliculares de vacas das raças Nelore e Red Angus. O alcance dessa meta, ou seja, o desenvolvimento de um protocolo de otimização da função luteínica de vacas de corte disponibiliza uma prática pecuária inovadora, a qual está descrita detalhadamente no presente Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.

Termos para indexação: bovino, prenhez, embrião, GnRH, hCG.

¹ Médico Veterinário, Dr., pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, rui@cppse.embrapa.br

² Médico Veterinário, Dr., Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, marco@cppse.embrapa.br

³ Médico Veterinário, Dr., pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, ricardoaf@cenargen.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, PhD., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

Strategies to reduce embryo mortality in cattle: I. Pharmacological alternatives to optimize the luteal function of beef cows

Abstract

Early embryo mortality is the major cause of reproductive losses in cattle raised in the northern hemisphere. Once reproductive performance of Brazilian cattle is low, it is expected that such losses also occur with zebu beef cattle raised in Brazil. In order to further study this issue and create strategies to minimize pregnancy losses, Embrapa Pecuária Sudeste developed a research project entitled "Embryo mortality in cattle and strategies for its reduction", which have as its main objective to determine the rate and the specific chronology of reproductive losses in Nelore cows after mating. The project also intended to develop a pharmacological protocol to optimize luteal function in beef cows. In order to do so, different hormonal treatments to control follicular and luteal function were evaluated in Red Angus and Nelore cows. The development of an efficient protocol to control ovarian function makes available an innovative husbandry practice, which is fully addressed in this Research and Development Bulletin.

Index terms: cattle, embryo, GnRH, hCG, pregnancy.

Introdução

A eficiência reprodutiva é o fator que individualmente mais influencia a produtividade e a lucratividade da exploração pecuária de corte (NEUMANN e LUSBY, 1986). Entretanto, a taxa de parição após uma única inseminação artificial (IA) situa-se por volta de 53% em vacas de corte (DISKIN; SREENAN, 1980), embora as taxas de fertilização sejam aproximadamente de 100% (AYALON, 1978), o que indica elevado percentual de perdas de prenhez nas vacas de raças européias criadas no hemisfério norte. No Brasil, como as taxas de parição das vacas de corte são estimadas em cerca de 50% (ANUALPEC, 2007) conjetura-se existir elevadas perdas de prenhez. A necessidade de conhecimento específico sobre o assunto motivou a elaboração de um projeto de P, D & I na Embrapa Pecuária Sudeste intitulado “Mortalidade embrionária em bovinos e estratégias para a sua redução”, o qual teve dentre seus objetivos o de desenvolver alternativas para reduzir as perdas de prenhez em bovinos. Para atingi-lo foram realizados quatro experimentos. Nesta obra, descreve-se um deles e também se apresentam resultados de outro experimento, relativo a um projeto colaborativo com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a iniciativa privada. O objetivo do presente Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento é apresentar resultados desses experimentos, os quais resultaram no desenvolvimento de uma prática pecuária de interesse para a otimização e intensificação dos sistemas de produção de bovinos de corte criados em condições subtropicais. A dinâmica de apresentação desta obra tomou como base os preceitos apresentados no manual de indicadores (ÁVILA; BORGES, 2007), que classifica os resultados como finalísticos, quando os mesmos resultam numa prática pecuária, conceituada como um conjunto de procedimentos e/ou técnicas utilizadas na produção pecuária, inovados ou adaptados.

Revisão de Literatura

O impacto das perdas de prenhez nos bovinos reflete-se diretamente na lucratividade dos empreendimentos pecuários. Flint et al. (1990) contabilizaram 300 milhões de libras esterlinas como prejuízos devidos às perdas embrionárias só no Reino Unido. No agronegócio brasileiro, Machado et al. (2009 – dados não publicados) estimaram prejuízos anuais de quase um bilhão de dólares causados apenas pela mortalidade embrionária precoce, que é responsabilizada pela maioria das perdas reprodutivas (KUNZ et al., 2002). Diskin e Sreenan (1980) constataram que a maioria das perdas pré-natais das vacas ocorria até o 16º dia da gestação. Similarmente, Dunne et al. (2000) verificaram que a maioria das perdas pré-natais ocorria antes do 14º dia da gestação de novilhas. No Brasil, Machado et al. (2009 - dados não publicados) concluíram que a maior ocorrência de perdas de prenhez se dá até o 18º dia desde a IA. Coletivamente, esses achados fazem inferir que a cronologia da mortalidade embrionária precoce (MEP) relaciona-se aos eventos fisiológicos do estabelecimento da prenhez na vaca, como a sinalização pelo embrião de sua presença no útero para a unidade materna e a luteólise. Assim, distúrbios da interação entre o concepto (embrião em desenvolvimento envolto nas membranas extra-embrionárias) e a unidade materna resultam em MEP. De fato, as causas mais prevalentes da MEP não são de natureza infecciosa (CHRISTIANSON, 1992).

A importância da interação concepto-unidade materna é ilustrada pelo fato de que até o reconhecimento materno da prenhez, a fisiologia uterina e ovariana das vacas com atividade estral é igual à das vacas prenhes, prevalecendo um mecanismo para a síntese pré-programada da prostaglandina do grupo $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio. Portanto, o reconhecimento materno da prenhez (RMP) ocorre quando o concepto sinaliza bioquimicamente sua presença no útero e por consequência bloqueia a produção da $PGF_{2\alpha}$ mantendo um corpo lúteo (CL) funcional (MANN et al., 1999). Essa glândula é responsável pela secreção da progesterona, hormônio que prepara o útero para receber, nutrir e manter o embrião e o feto até o parto.

O período crítico (PC) do RMP ocorre entre os dias 15 e 17 após a IA da vaca, intervalo no qual a sinalização pelo conceitoo deve ter sido bem sucedida, pois a simples existência do embrião no útero não assegura o bloqueio da luteólise e o RMP (BINELLI et al., 2001). A habilidade do embrião em secretar moléculas sinalizadoras para inibir a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ depende do tamanho do conceitoo e da área que ele ocupa no endométrio. Portanto, conceptos maiores têm melhor chance de sobrevivência (BINELLI et al., 2001). Ocorre que, o desenvolvimento dos conceptos é dependente da condição do útero até o PC, a qual depende da progesterona secretada. Portanto, a função luteínica é a chave do sucesso para o RMP. De fato, vacas inseminadas e que não se tornaram prenhes tiveram concentração de progesterona circulante menor do que aquelas que se tornaram prenhes (MACHADO, 1994) e a suplementação exógena com progesterona aumentou a taxa de crescimento embrionário e sua capacidade de produzir moléculas sinalizadoras como o interferon- τ (GEISERT et al., 1988). Portanto, conclui-se que vacas com corpo lúteo de alta capacidade para produzir progesterona favorecerão o desenvolvimento do conceitoo e o bloqueio da luteólise, resultando em RMP bem sucedido e prevenção da MEP.

Para otimizar a função luteínica logo após a IA da vaca têm sido descritos tratamentos que usam a aplicação de hormônios no início da fase luteínica. Há protocolos com a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e com o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). A hCG tem atividade análoga ao hormônio luteinizante (LH). Quando ela é aplicada quatro a sete dias após o estro causa a ovulação do folículo dominante (DOM) da 1ª onda de crescimento e a formação de um corpo lúteo acessório. Além disso, a hCG aumenta o tamanho das células luteínicas do CL pré-existente. Esses efeitos resultam em aumento no tamanho do CL e na produção de progesterona (MACHADO et al., 2008). O mecanismo de ação do GnRH (e de seus agonistas, como a busarelina e a gonadorrelina) é indireto, mediante liberação de gonadotrofinas endógenas como o LH, o qual induz a ovulação ou a luteinização de folículos em crescimento. Por essa razão, seus efeitos podem ser menos intensos que os da hCG, ou seja, a formação

de corpos lúteos acessórios é menos frequente e o aumento da concentração de progesterona é de menor amplitude (BINELLI et al., 2001). Entretanto, é escassa a literatura sobre o uso de estratégias para melhorar a função luteínica pós-ovulação em vacas zebuínas (BINELLI et al., 2001; MACHADO et al., 2008; MARQUES, 2002). Assim, há a necessidade de se avaliar a resposta fisiológica de vacas de corte, especialmente das zebuínas, aos protocolos de otimização da função luteínica. Isto se torna relevante devido às oportunidades de aumento no uso da IA para os rebanhos de vacas de corte no Brasil (BARBOSA; MACHADO, 2008).

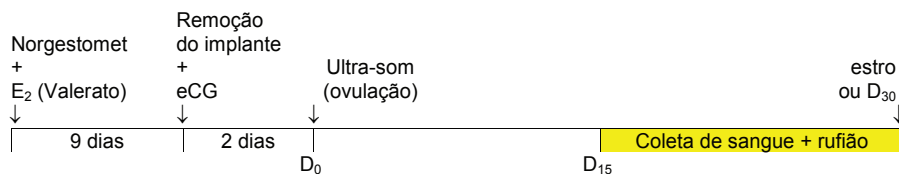
Material e métodos

O experimento um (E1) foi conduzido na Fazenda Cardinal (Mococa, SP) do grupo VPJ como resultado de uma parceria entre a Embrapa e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O experimento dois (E2) foi conduzido na Fazenda Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP) com clima tropical (tipo CWA, Köppen) de verão quente e úmido com inverno seco.

No E1 foram utilizadas 17 vacas da raça Red Angus (*Bos taurus taurus*) com idade de $46,3 \pm 0,4$ meses, peso vivo de $500,3 \pm 30,5$ kg, score de condição corporal (ECC) de $5,0 \pm 0,3$ (escala de 1 a 9; SPITZER et al., 1986) e $150,5 \pm 12,6$ dias pós-parto ao início do experimento. Os animais foram manejados em piquetes de grama Estrela (*Cynodon plectostachyum* Pilger) com livre acesso a sal mineralizado e água. Foram suplementados com feno de aveia (*Avena sativa* L.) e 3 kg/dia de rolão de milho (*Zea maiz* L.). Os animais foram vacinados contra febre aftosa em novembro e maio, clostridiose bovina em novembro e agosto e pasteurelose bovina e paratifo no período peri-parto e foi feito também o teste para tuberculose. Os endo-parasitas foram controlados no início da estação de monta, com doramectina e o controle de ecto-parasitas foi feito de acordo com a infestação. O controle das doenças da reprodução baseou-se na realização de testes

diagnósticos (CARDOSO et al., 1999) para brucelose e neosporose (soro-aglutinação), BVD e IBR (neutralização viral) e Leptospirose (soro-aglutinação microscópica). O ciclo estral foi sincronizado pela inserção subcutânea de um implante comercial com 3 mg de norgestomet na face convexa da orelha, associado a uma injeção intramuscular (IM) da combinação de 3 mg do norgestomet e 5 mg do valerato de estradiol. Nove dias depois se retirou o implante e aplicou-se uma injeção IM com 300 UI da gonadotrofina da égua prenhe (eCG). Onze vacas com ovulação sincronizada (dia zero = D₀) permaneceram no experimento e foram divididas num delineamento inteiramente casualizado em: grupo controle (CT) - que não recebeu tratamento adicional (n=5) e grupo remoção farmacológica do folículo dominante (RF) - que recebeu 200 µg de gonadorrelina (análogo do GnRH) IM no D5 e 3000 UI da hCG no D12 (n=6). A observação do estro foi feita por 60 minutos, duas vezes ao dia (as 07h00min e 17h00min horas) a partir do D15 até a manifestação do estro ou até o encerramento do experimento (D30). Houve a inclusão de um rufião por grupo para auxiliar na detecção do estro. Foram coletadas diariamente amostras de sangue para a separação do plasma e posterior dosagem de progesterona, desde D15 até a apresentação do estro ou até D30. O sangue colhido por punção veia jugular foi mantido em tubo heparinizado e centrifugado (693 g por 15 minutos). O plasma obtido foi transferido para micro-tubos de polipropileno e mantido a -20°C até a dosagem de progesterona, que foi feita por radioimunoensaio (KNICKERBOCKER et al., 1986). O corpo lúteo foi considerado funcional quando a concentração plasmática de progesterona era igual ou maior a 1,0 ng/mL (BERGAMASCHI, 2005). Na Figura 1 apresenta-se a cronologia dos tratamentos.

CT - controle



RF - remoção farmacológica

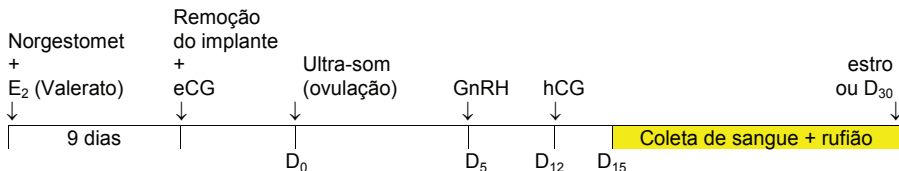
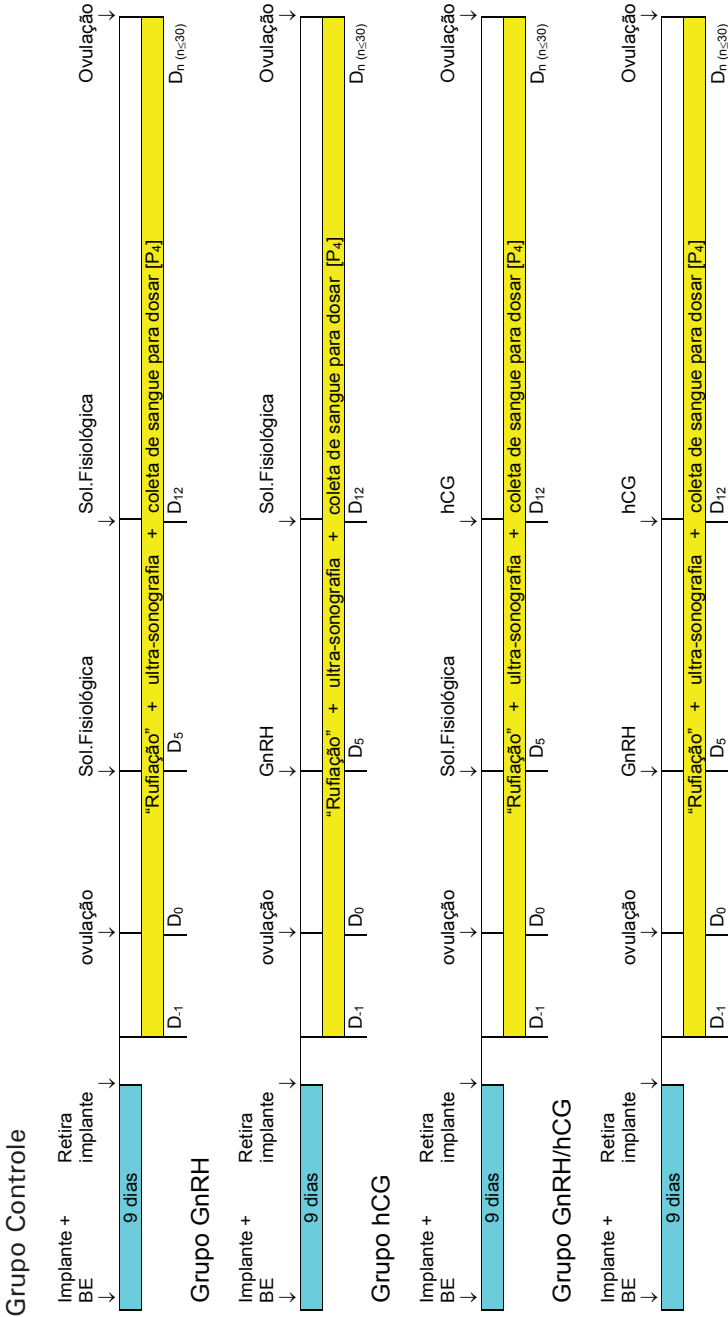


Figura 1 - Protocolos de administração dos tratamentos no experimento 1.

No E2 foram utilizadas 40 vacas Nelore adultas e cíclicas com idade de 4 a 11 anos, peso vivo de $502,8 \pm 9,1$ kg, ECC de $6,7 \pm 0,1$ (SPITZER et al., 1986) e pelo menos 240 dias pós-parto ao início do experimento. As vacas permaneceram em pastagens de *Brachiaria* sp com acesso a sal mineral e água. O manejo sanitário adotado foi análogo ao do E1. As vacas foram submetidas à indução da ovulação pela inserção subcutânea de implante (3 mg de norgestomet) associado à injeção IM de 2 mg benzoato de estradiol (BE). Nove dias depois o implante foi removido e foram aplicados 150 mg de d-cloprostenol. Outra dose de BE foi ministrada no dia seguinte. As vacas que responderam com ovulação sincronizada (D_0) foram divididas em delineamento inteiramente casualizado nos grupos ($n=10$ cada): **controle (CON)**: sem tratamento adicional; **GnRH (GnRH)**: receberam uma injeção IM de 250 μ g de gonadorrelina (GnRH) no dia 5 do ciclo estral sincronizado (D_5); **hCG (hCG)**: receberam uma injeção IM 2500 UI da hCG no D_{12} ; e **GnRH e hCG (GnRH/hCG)**: receberam GnRH no D_5 e hCG no D_{12} , como mostrado na Figura 2.



Siglas: BE = benzoato de estradiol; PGF_{2α} = d-Cloprostenol; GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas; hCG = gonadotrofina coriônica humana; [P₄] = concentração plasmática de progesterona.

Figura 2 – Protocolos de administração dos tratamentos no experimento 2.

A observação do comportamento do estro, os exames ultrassonográficos dos ovários (BERGAMASCHI, 2005) e as colheitas de sangue foram realizados diariamente, desde o D_{-1} até o D_{30} ou a apresentação da ovulação do ciclo seguinte (o que ocorreu antes). A identificação das vacas em estro foi auxiliada pela inclusão dum rufião equipado com aparato “chin-ball” para cada grupo. O procedimento de coleta, manutenção e dosagem das amostras de progesterona foi similar a E1. Os resultados de ambos os experimentos foram analisados com o programa SAS System for Windows (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2000). Variáveis que não atenderam as premissas de normalidade dos resíduos e de homogeneidade das variâncias foram transformadas pelas funções logarítmica ou de raiz quadrada para posterior análise estatística. A concentração plasmática de progesterona foi analisada por ANOVA com medidas repetidas no tempo pelo proc MIXED do SAS. As variáveis discretas foram submetidas à ANOVA pelo proc GLM do SAS e as variáveis tomadas como “taxas” ou “ocorrências” foram expressas como proporções e analisadas aplicando-se o teste exato de Fischer (GOMES, 1987). Os resultados foram apresentados na escala não-transformada como média pelo quadrados mínimos \pm erro padrão da média. Os efeitos das fontes de variação foram considerados significativos para a probabilidade de até 5% ($P < 0,05$). Conceituou-se como tendência, quando as probabilidades estiveram entre 5% e 10% ($0,05 < P < 0,10$).

Resultados

E1

A Figura 3 contém a representação gráfica das concentrações de progesterona plasmática em função do dia do ciclo estral. Os valores para RF foram maiores ($P < 0,05$) que o CT do D_{17} ao D_{20} e a fase luteínica foi prolongada. Ao longo do experimento, duas vacas do RF não apresentaram estro, enquanto todas do CT ($5/5 = 100\%$) mostraram. A duração do ciclo estral não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos e foi de $20,0 \pm 1,2$ dias para CT ($n = 5$) e $29,0 \pm 1,1$ dias

para RF (n=4). Houve vacas com folículos >8mm em ambos os grupos durante o PC do RMP. O diâmetro do maior folículo das vacas controle foi de: $11,2 \pm 1,2$ mm em D14; $13,2 \pm 1,0$ mm em D17; e $11,4 \pm 1,9$ mm em D20. No caso do RF, essas médias foram: de $11,6 \pm 2,4$ mm em D14; $12,7 \pm 1,7$ mm em D17; e $15,43,2$ mm em D20.

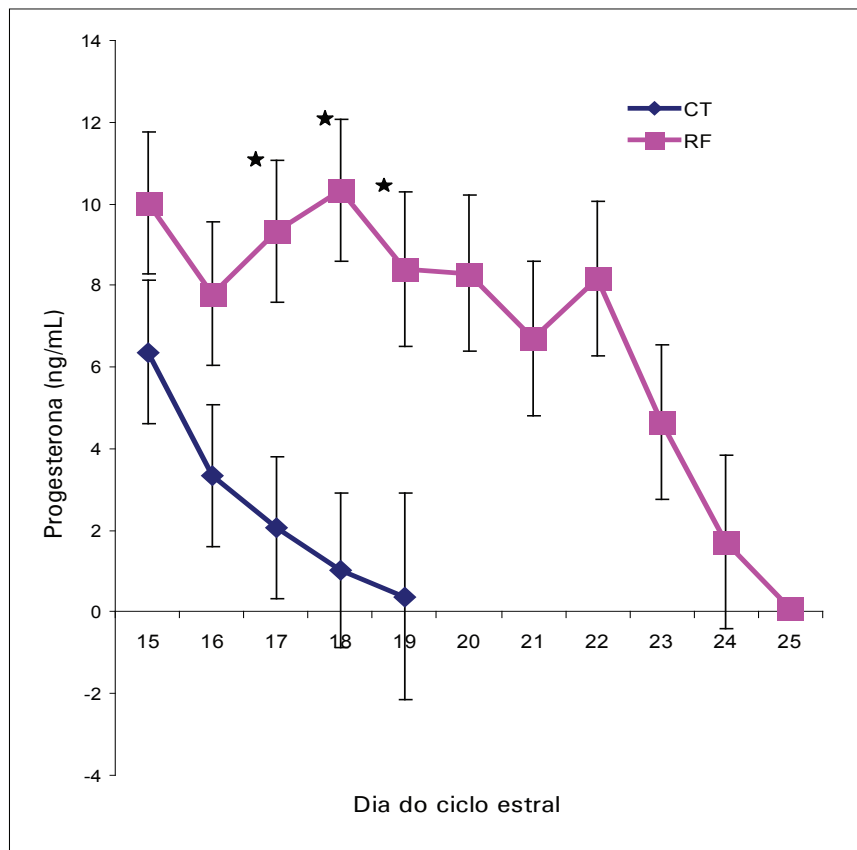


Figura 3 - Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) ao final da fase luteínica do ciclo estral para os grupos: controle (CT) e remoção farmacológica (RF). Médias com ★ diferem estatisticamente ($P < 0,01$).

Na Tabela 1 constam as médias para as variáveis derivadas das dosagens de progesterona. Em geral, o efeito luteotrófico em RF refletiu-se em todas variáveis na tabela. O dia do ciclo estral da concentração máxima de progesterona foi: $15,0 \pm 0,0$ e $17,0 \pm 1,2$, respectivamente para CT e RF.

Na Tabela 2 se encontra a resposta individual das vacas do RF aos desafios com GnRH e hCG. Na Figura 4 estão apresentados os gráficos das vacas CT e RF relativos à concentração de progesterona.

Tabela 1 - Médias dos quadrados mínimos (erros-padrão da média) para variáveis discretas relativas à função luteínica e à luteólise.

Variável	Médias \pm erros-padrão da média		Pr > F
	Controle	remoção farmacológica	
FASELUT (dias) ^a	$17,20 \pm 1,05$	$22,60 \pm 1,05$	0,01
P4MAX (ng/mL) ^b	$6,37 \pm 1,74$	$13,52 \pm 1,74$	0,05
P4MED (ng/mL/dia) ^c	$4,07 \pm 0,90$	$7,95 \pm 0,90$	0,01
Dia da luteólise ^d	$18,20 \pm 1,05$	$23,60 \pm 1,05$	0,01
Inter Lise-cio (dias) ^e	$1,80 \pm 0,72$	$4,00 \pm 0,81$	0,10

a) fase luteínica, b) concentração plasmática de progesterona ($[P_4]$) máxima, c) $[P_4]$ média, d) dia do ciclo estral que ocorreu a luteólise ($[P_4] < 1,00$ ng/mL), e) intervalo entre a luteólise e a manifestação do estro.

Tabela 2 - Resposta individual das vacas do grupo remoção farmacológica¹ em relação à formação de corpo lúteo (CL) acessório, produção de progesterona e manifestação do estro.

Vaca	CL acessório ² em resposta à aplicação de		$[P_4]$ máxima ³ (ng/mL)	Fase luteínica ⁴ (dias)	Dia do estro
	GnRH	hCG			
73	0	1	7,16	22	28
104	1	0	9,33	17	-
186	0	1	15,35	27	30
300	0	0	15,08	23	28
313	1	0	20,71	24	30

¹ Este grupo recebeu 200 μ g de gonadotrofina no D_5 e 3000 UI de hCG no D_{12} ;

² Identificado nas ultra-sonografias de D_{14} , D_{17} e D_{20} ;

³ Maior Concentração de progesterona plasmática ($[P_4]$) entre D_{15} e a luteólise;

⁴ Último dia do ciclo em que a $[P_4]$ foi $\geq 1,0$ ng/mL.

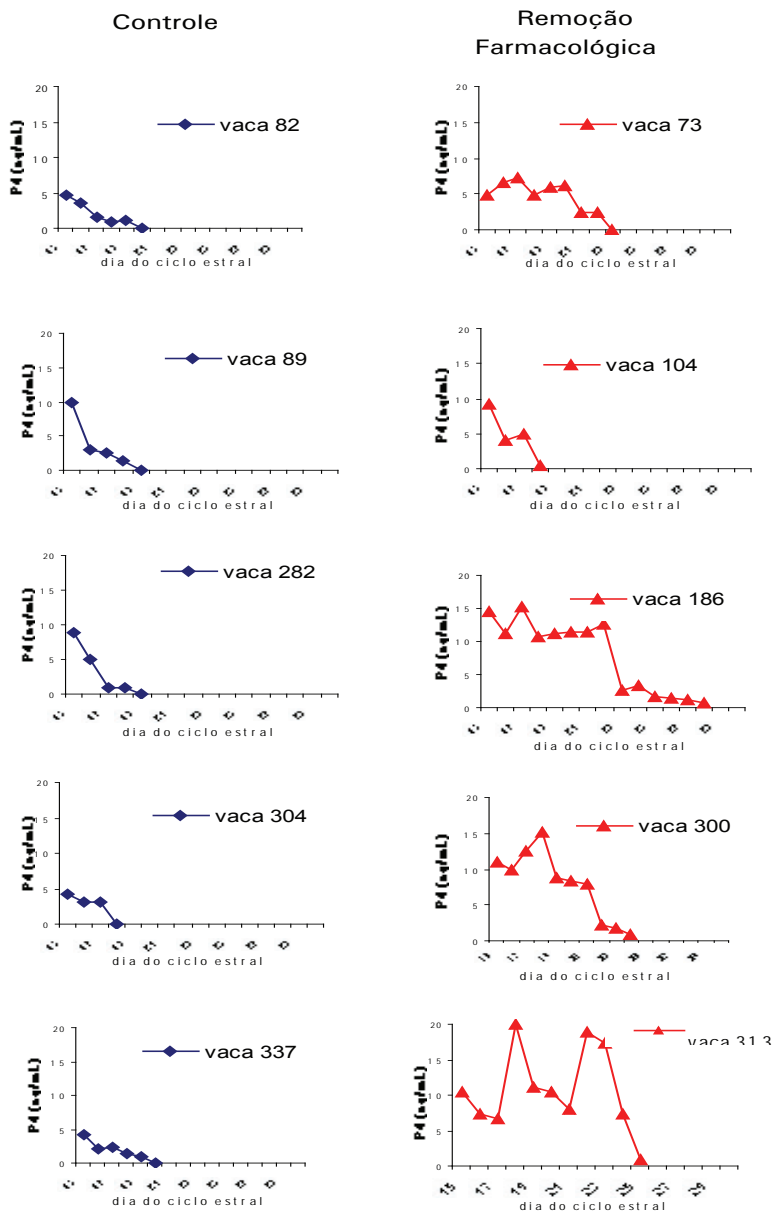


Figura 4 – Concentrações plasmáticas de progesterona (P4) em função do dia do ciclo estral e do tratamento.

E2

Os principais resultados desse experimento estão sumariados na Tabela 3. O efeito dos tratamentos sobre a concentração de progesterona circulante ao final da fase luteínica e dentro do PC encontra-se na Figura 5.

Tabela 3 - Comportamento reprodutivo e função ovariana de vacas Nelore* segundo o tratamento pós-ovulatório imposto (média \pm erro padrão).

	Controle	GnRH	hCG	GnRH/hCG
Duração do ciclo estral (dias)	22,75 \pm 1,12 ^{a, b}	21,60 \pm 0,82 ^b	24,80 \pm 0,49 ^{a, b}	25,33 \pm 1,13 ^a
Nº de Corpos Lúteos.	1,00 \pm 0,00 ^B	1,30 \pm 0,14 ^B	1,70 \pm 0,16 ^{A, B}	2,11 \pm 0,21 ^A
Nº de ondas de crescimento folicular	2,10 \pm 0,11 ^b	2,30 \pm 0,16 ^{a, b}	3,20 \pm 0,21 ^a	2,78 \pm 0,29 ^{a, b}
Intervalo entre ovulações - dias	23,70 \pm 1,07 ^{A, B}	22,50 \pm 0,85 ^B	25,75 \pm 0,55 ^A	24,40 \pm 0,90 ^{A, B}
Fase luteínica (dias)	15,2 \pm 0,82 ^b	13,0 \pm 0,66 ^b	17,8 \pm 3,95 ^a	18,0 \pm 1,01 ^a
Concentração média de P ₄ (ng/mL)	3,69 \pm 0,37 ^b	4,55 \pm 0,63 ^{a, b}	4,62 \pm 0,65 ^a	5,22 \pm 0,45 ^a
Nº de dias com Fol. Dominante \geq 7mm	1,90 \pm 0,43	2,30 \pm 0,35	1,20 \pm 0,47	1,88 \pm 0,45
Nº de dias com Fol. Dominante \geq 8mm	1,50 \pm 0,42	1,80 \pm 0,38	0,80 \pm 0,38	1,67 \pm 0,43

* a>b com P<0,05 e A>B com P<0,01.

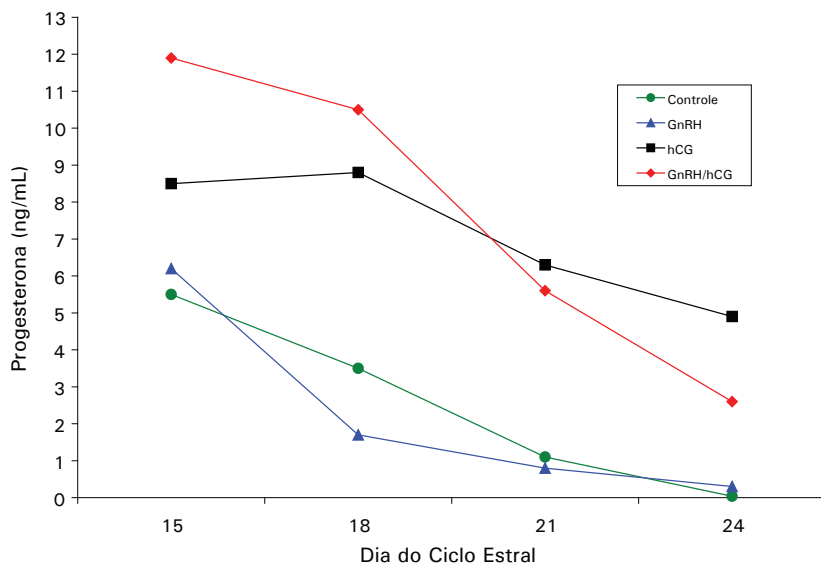


Figura 5 - Concentração plasmática de progesterona entre os dias 15 e 24 do ciclo estral de vacas Nelore segundo o tratamento hormonal imposto.

Discussão

A combinação GnRH/hCG otimizou a função luteínica e controlou o desenvolvimento folicular tanto em vacas taurinas (E1) como nas zebuínas (E2).

As bases fisiológicas para a criação dos tratamentos impostos no E1 e no E2 foram determinadas pelo modo de ação de cada hormônio aplicado. Antecipava-se que o GnRH aplicado no D₅ induziria a ovulação do DOM da primeira onda, formaria um CL acessório e recrutaria, de modo sincronizado, a segunda onda de crescimento folicular. A hCG administrada no D₁₂ causaria a ovulação do DOM da segunda onda e induziria a formação de um 2º CL acessório, bem como recrutaria uma terceira onda no dia D₁₅ pós-ovulação. Deste modo, os folículos em crescimento dessa onda estariam menores que 8 mm até D₁₉, o que resultaria em menor disponibilidade de estrógenos circulantes. Este efeito equivaleria à “remoção farmacológica” do folículo dominante no PC do RMP, o que poderia retardar o estímulo luteolítico e aumentar o período de exposição progesterônica ao conceito. Adicionalmente, a hCG estimularia os corpos lúteos (original + acessórios) a produzirem mais progesterona, o que prepararia ainda mais o ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário. Em síntese, esta imbricada cascata de eventos teria como resultante líquida a otimização da função luteínica e o controle do crescimento folicular durante o RMP.

O RF otimizou a função luteínica e controlou a função folicular, embora não tenha removido eficientemente o folículo dominante no período crítico. Fato justificável pela inconsistência na resposta ovulatória ao desafio com o GnRH (Tabela 2) como reportado previamente (KASTELIC; MAPLETOFT, 1998). Apesar disso, o protocolo bloqueou eficientemente a luteólise (Tabela 2). Para Peters (1996) o uso de agentes luteotróficos, como o GnRH, entre D₁₁ e D₁₃ após a inseminação previne a luteólise, devido ao poder supressor dessas drogas sobre a secreção folicular do 17_β-estradiol e uterina da PGF_{2α}.

No presente experimento, usou-se a hCG em D12 ao invés do GnRH no D_{11 a 13}. Apesar da hCG ter induzido ovulação em apenas duas vacas, a resultante líquida da sua ação decorreu como antecipado, pois causou o prolongamento da fase luteínica na maioria dos animais (Tabela 2 e Figura 4). Portanto, embora houvesse um folículo dominante em três vacas do RF no D17 e em todas as vacas no D20, a influência desse DOM mediada por estrógenos foi deprimida já que a luteólise foi retardada e só ocorreu entre D22 e D23 (Figuras 3 e 4). Além disso, e baseado no fato que a manifestação do estro depende da concentração circulante de estrógenos (HAFEZ et al., 1988), a competência esteroidogênica do folículo dominante correspondente esteve aparentemente deprimida, pois o intervalo entre a luteólise e o estro tendeu a ser maior ($0,05 < P < 0,10$) no RF do que no CT.

A associação GnRH/hCG teve um efeito luteotrófico prolongado e continuado (Figura 3), pois no RF foram observadas concentrações de progesterona maiores que 8 ng/mL ainda no D19 (Figura 3), data considerada como o limite temporal superior do período crítico para o reconhecimento da prenhez. No mesmo dia, o grupo controle sequer mantinha concentrações tipicamente luteínicas (≥ 1 ng/mL). De fato, tanto a máxima concentração de progesterona dentro do ciclo estral como a concentração média de progesterona no período crítico do reconhecimento materno da prenhez foi para o RF aproximadamente o dobro das concentrações do CT (Tabela 1). Além disso, essa concentração média foi superior aos 8,4 ng/mL relatados por Marques (2002) entre D13 e D17 para receptoras de embrião suplementadas com 1500 UI de hCG à inovulação (D7) ou aos 8,1 ng/mL relatados por Bergamaschi (2005) para vacas Nelore que receberam eCG no protocolo de sincronização do ciclo estral baseado no Crestar®. Analogamente, os valores observados no presente experimento para o dia da luteólise e a duração da fase luteínica (Tabela 1) foram maiores que os relatados por Marques (2002) ou por Bergamaschi (2005). Coletivamente, estas comparações pressupõem que o protocolo GnRH/hCG foi a opção mais efetiva tanto para o bloqueio da luteólise como para a estimulação luteotrófica.

O mecanismo de ação para que a remoção farmacológica represente um estímulo luteotrófico potente relacionou-se possivelmente aos efeitos combinados, suplementares e mesmo substituintes das ações do GnRH no D5 e da hCG no D12 sobre a função luteínica. Assim, independentemente da formação de um corpo lúteo acessório em resposta ao GnRH e/ou à hCG (Tabela 2), o efeito luteotrófico se instalou. Tal achado representa um indício da ação luteotrófica direta daqueles agentes sobre os corpos lúteos preexistentes. Inferência similar foi encontrada por Fricke et al. (1993). Portanto, o efeito luteotrófico exercido pela associação GnRH/hCG aumentou as concentrações circulantes da progesterona ao longo de todo o período crítico e pode representar uma estratégia eficaz na redução da mortalidade embrionária em bovinos. De fato, Marques (2002) reportou que as taxas mais altas de concepção ocorreram para as receptoras suplementadas com GnRH ou hCG à inovulação (D₇). Em outros estudos, os agentes luteotróficos não reduziram a mortalidade embrionária (ARAÚJO et al., 1998; GALIMBERT et al., 1998).

Os efeitos da combinação GnRH/hCG sobre as vacas Nelore (E2) foram análogos aos verificados para vacas Red Angus (E1) tanto na otimização da função luteínica, como no controle do desenvolvimento folicular.

Cumprido destacar, que no E2 não houve resposta ($P > 0,05$) das vacas do grupo GnRH quando comparadas às do controle. A ação do GnRH é baseada na sua capacidade de induzir a liberação de LH e indiretamente causar a ovulação (ou a luteinização do folículo dominante) e a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular (BÓ et al., 2002). Porém, a indução da ovulação pelo GnRH relaciona-se ao estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento da sua aplicação (KASTELIC; MAPLETOFT, 1998) e a ação luteotrófica do LH é restrita à sua meia vida circulante, que é de apenas 30 minutos (HAFAZ et al., 1988). Portanto, o GnRH pode ser ineficaz caso os estoques de LH na hipófise estejam baixos ou não haja disponibilidade de receptores de LH nas células foliculares naquele momento. De fato,

no presente experimento, o GnRH falhou em provocar a ovulação do DOM da primeira onda em algumas vacas e não houve a formação do CL acessório e nem o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular, essas “não-ocorrências” resultaram num ciclo estral e num desenvolvimento luteínico similar ao observado para as vacas controle.

A aplicação isolada da hCG no D₁₂ mostrou efeito luteotrófico se comparado ao grupo controle. Esse resultado assume especial relevância, pois a hCG aplicada próxima ao final da fase luteínica tem sido pouco estudada. Neste experimento, a hCG dada no D12 induziu a formação de um CL acessório na maioria das vacas ($1,70 \pm 0,16$), resposta comparável àquela obtida quando da aplicação ao início da fase luteínica (BENNETT et al., 1989). Para Price e Webb (1989), a resposta ótima observada entre D4 e D7 se deve à existência de maior número de receptores para LH nas células da granulosa nesse intervalo, o que acarreta a ovulação do folículo dominante da 1ª onda de crescimento, a neo-formação de um corpo lúteo acessório (DIAZ et al., 1998; FRICKE et al., 1993) e o estímulo da função do corpo lúteo original. Esse último efeito é amplificado pela longa meia-vida da hCG e da lenta degradação do complexo hCG-receptor para LH nas células da granulosa (FRICKE et al., 1993) exercidos sobre o corpo lúteo original preexistente em D5. No caso do presente experimento, os resultados amparam a inferência de que, os mesmos efeitos ocorreram com a aplicação da hCG em D12, pois também houve neo-formação de tecido luteínico por meio do desenvolvimento de um outro corpo lúteo acessório. A resultante principal foi o aumento na produção de progesterona (Figura 5; Tabela 3) como reportado para a aplicação da hCG em D5 (BENNETT et al., 1989).

Portanto, a exemplo do ocorrido no E1 com vacas taurinas, a ação luteotrófica do protocolo GnRH/hCG para as vacas Nelore foi contundente, consistente (Figura 5 e Tabela 3) e logrou aumentar a progesteronemia da fase luteínica, fato importante para manutenção da prenhez, pois em estudos prévios, as fêmeas com concentração plasmática de progesterona mais baixa após a inseminação artificial apresentaram taxas de concepção menores (MACHADO, 1994; MANN et al., 1999).

Assim, a resposta fisiológica esperada após este protocolo se confirmou, embora tenha sido constatada a presença de DOM no PC em todos os tratamentos impostos. Não obstante, o achado importante e inédito é o consistente prolongamento do ciclo estral, devido à extensão da fase luteínica, tanto em vacas taurinas como em zebuínas.

Uma vez que nenhuma abordagem farmacológica testada conseguiu eliminar completamente a presença do folículo dominante no período crítico (Tabela 3) era esperada a ocorrência iminente da luteólise dentro do período crítico (MACHADO et al., 2008). Porém, a luteólise foi retardada no(s) grupo(s) hCG e GnRH/hCG (Figura 5), o que permite conjecturar que a ação estrogênica do DOM não é o único fator determinante do momento de ocorrência da luteólise. Ainda nesse contexto e como a maioria dos ciclos de vacas Nelore adultas possui duas ondas de crescimento folicular (FIGUEIREDO et al., 1997), antecipava-se a emergência de uma terceira onda após a aplicação da hCG (SIANGAMA; RAJAMAHENDRAN, 1996; FIGUEIREDO et al., 1997), o que de fato ocorreu (Tabela 3). A indução da onda adicional otimiza o mecanismo anti-luteolítico (AHMAD et al., 1997), pois fêmeas com duas ondas têm um folículo potencialmente estrogênico (diâmetro $\geq 10\text{mm}$) já no dia 13,5 do ciclo estral, quatro dias antes daquelas de três ondas (DIAZ et al., 1998) e, portanto há um menor intervalo para desenvolvimento do folículo ovulatório (MIHM et al., 1999). Coletivamente, esses resultados dão suporte aos achados do presente experimento, muito embora Diaz et al. (1998) e Sianangama e Rajamahendran (1996) concluíssem não existir diferença na cronologia dos eventos da luteólise entre vacas de duas ou de três ondas.

Além do retardamento na luteólise, houve significativo estímulo à produção da progesterona nas recipientes de hCG, eventos que se relacionam entre si. Grazzini et al. (1998) concluíssem que sob influência progesterônica, a afinidade de ligação da ocitocina por seus receptores é diminuída, o que inibe o desencadear da luteólise. No entanto, achados mais recentes contrapõem essa inferência. Binelli et al. (2004) verificaram que o estradiol estimulou a liberação da

PGF_{2α} independentemente da ação da progesterona no dia 17 do ciclo estral. Fato consistente com os achados de Goissis et al. (2004) que verificaram maior liberação de PGF_{2α} em resposta aos estrógenos dados em D17 em vacas portadoras de corpo lúteo acessório e Machado et al. (2008) verificaram que a hCG dada previamente ao 17β-estradiol amplificou seus efeitos luteolíticos, pois a hCG aumenta a afinidade entre a PGF_{2α} e os seus receptores nas células luteínicas (NIASARI-NASLAJI et al., 1996). Portanto o retardamento da luteólise observado no presente experimento pode estar relacionado a outros mecanismos, os quais merecem estudos específicos.

O prolongamento da fase luteínica causado pela hCG depende da ocasião de aplicação, pois quando ministrada entre D4 e D7 não alterou o processo de luteólise que se iniciou em D16 para vacas controle e em D15 para aquelas tratadas com hCG no D5 (MACHADO et al., 2008). Achados concordantes com os de Diaz et al. (1998) onde a luteólise se completou no dia 21 do ciclo estral, para vacas tratadas ou não com 3000 UI de hCG no D5. Esse vínculo temporal possivelmente deve-se aos atributos bioquímicos da hCG, que lhe conferem uma meia-vida prolongada e uma lenta degradação do complexo hCG-receptores do LH. Fatores que explicam o seu efeito continuado e a obtenção de concentrações de progesterona muito altas no final da fase luteínica, como verificado no D₁₉ dos grupos hCG e GnRH/hCG (Figura 5). Destaca-se que este dia (D₁₉) é considerado como o limite temporal superior do período crítico para o reconhecimento da prenhez. No mesmo dia, o grupo controle apresentava concentração de progesterona próxima do limite sub-luteínico (1,0 ng/mL). Analisando-se as concentrações de progesterona dentro do PC (Figura 5) e em analogia aos resultados do E1 (Figuras 3 e 4), verifica-se que seus valores foram aproximadamente o dobro nas recipientes de hCG quando comparados aos dos grupos que não receberam a gonadotrofina.

Além disso, a literatura é abundante sobre outras estratégias de otimização da função do corpo lúteo. Uma abordagem pré-ovulação que vem se popularizando é administração de gonadotrofina coriônica

equína (eCG) por ocasião da sincronização do estro (BERGAMASCHI, 2005). No presente experimento, o grupo que recebeu 3000 UI hCG no D12 apresentou concentrações de progesterona no diestro tão altas quanto às relatadas por Bergamaschi (2005) com a aplicação de 500 UI da eCG antes da ovulação de vacas Nelore. Analogamente, a concentração de progesterona entre o D₁₃ e o D₁₇, o dia ocorrência da luteólise e a duração da fase luteínica, observadas no presente experimento para o GnRH/hCG foram maiores do que os relatados previamente (MARQUES, 2002; BERGAMASCHI, 2005). Assim, a aplicação da hCG no D₁₂ manteve o útero sob ação progesterônica no período de interesse para a comunicação entre o concepto e a unidade materna, ocorrência que favorece o crescimento do concepto (BINELLI; THATCHER, 1999), a sinalização bioquímica de sua presença no útero e a manutenção da prenhez (BINELLI et al., 2001).

Conclusões

A hCG aplicada no D12 tem potente ação luteotrófica, pois os protocolos RF (E1), hCG e GnRH/hCG (E2) otimizaram a função do corpo lúteo;

Nenhum protocolo testado controla perfeitamente a função folicular, de modo a prevenir a presença do DOM no PC, porém os protocolos com hCG reprogramam a função ovariana e reduzem a influência do DOM sobre o ciclo ovariano;

A estratégia baseada na combinação GnRH/hCG retarda a luteólise, amplia a fase luteínica e aumenta a produção de progesterona no período crítico. A intensidade desses efeitos torna o protocolo GnRH/hCG uma abordagem farmacológica efetiva para controle das funções ovariana e uterina, representando um alternativa a ser testada a campo para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos.

Implicação

O protocolo baseado nas aplicações intramusculares de um análogo do GnRH e da hCG, respectivamente cinco e doze dias depois da ovulação reprogramou a função ovariana de modo a otimizar a função luteínica de vacas de corte. O desenvolvimento dessa prática pecuária viabiliza uma solução tecnológica para reduzir a mortalidade embrionária precoce em bovinos. Atualmente, o uso do protocolo custa R\$ 42,50 por vaca tratada. A avaliação da relação benefício/custo está em progresso e será motivo de outra publicação da série Embrapa.

Referências

AHMAD, N.; TOWNSEND, E. C.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of waves of ovarian follicles, before and after breeding in beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 13-28. 1997.

ANUALPEC 2007. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2005. p. 53-80.

ARAÚJO, M. C. C.; FREITAS, C.; COSTA, E. P.; GALIMBERT, A. M.; SÁ, W. F. GUIMARÃES, J. D.; COSTA, D. S. GnRH analogous (buserelin) in bovine embryo recipients. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 1, (Supl. 26) p. 219, 1998.

ÁVILA, A. F. D.; BORGES, J. R. A. Manual dos indicadores de avaliação de desempenho dos centros de pesquisa da Embrapa_ ano base 2007. Brasília: Secretaria de Gestão Estratégica: Coordenadoria de Avaliação de Desempenho Institucional, 2007, 36 p.

AYALON, N. A review of embryonic mortality in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 483-93, 1978.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. **Panorama da inseminação artificial em bovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 28 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documento, 84). Disponível: <<http://www.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/documento84.pdf.view>>. Acesso em: 3 de mar. de 2011.

BENNETT, W. A.; GONZALEZ, L. V.; STUART, M. J.; FUQUAY, J. W. Effects of human Corionic Gonadotrophin pretreatment on endocrine, cytological and Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor patterns of the bovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 179-189, 1989.

BERGAMASCHI, M. A. C. M. **Estratégias hormonais para otimizar a função luteínica de vacas da raça Nelore após a sincronização do estro**. 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BINELLI, M.; LOUREIRO, J. G. P.; CUNHA, P. M. da; LIMA, W.; NOGUEIRA, G. P.; CIRILO, P. D.; BERTAN, C. M. Blocking progesterone receptors does not alter estradiol 17-estimated prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 338.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 59-85, 1999.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 52, p. 1451-1463, 2001.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 53-72, 2002.

CARDOSO, M. V.; SCARCELLI, E.; GENOVÊZ, M. E.; GRASSO, L. M. P.; TEIXEIRA, S. R.; TIMENETSKY, J. *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma spp* em disfunções reprodutivas inespecíficas de vacas e novilhas de rebanhos do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 408-409, 1999.

CHRISTIANSON, W. T. Stillbirths, mummies, abortions and early embryonic death. **The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 8, p. 623-639, 1992.

DIAZ, T.; SCHMITT, E. J. P.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, M. J.; THATCHER, W. W. HCG-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1929-1936, 1998.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between on? day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1, p. 39-44, 2000.

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

FLINT, A. P. F.; HEARN, J. P.; MICHAEL, A. E. The maternal recognition of pregnancy in mammals. **Journal Zoology**, v. 221, p. 327-341, 1990.

FRICKE, P. M.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Effect of human Corionic Gonadotrophin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteum function in cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1242-1246, 1993.

GALIMBERT, A. M.; FREITAS, C.; FONSECA, F. A.; FERREIRA, A. M.; ARAÚJO, M. C. C.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, D. S. One buserelin injection onday 5th after inoovulation on pregnancy rate of bovine embryo recipients. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 1, (Supl. 26) p. 277, 1998.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G.; GARRET, J. E.; WETTEMANN, R. P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 1, p. 11-25, 1988.

GOISSIS, M. D.; BRESSAN, F. F.; ALMEIDA, A. B.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M. Influence of an accessory corpus luteum on estradiol-17_β-induced prostaglandin F_{2α} release in cattle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 125.

GOMES, F. P. Análise de grupos de experimentos. In: GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 12.ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1987. p. 126-150.

GRAZZINI, E.; GUILLON, G.; MOUILLAC, B.; ZINGG, H. H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v. 392, p. 509-12, 1998.

HAFEZ, E. S. E.; LEVASSEUR, M. C.; TRIBAULT, C. Folliculogênese, maturação ovular e ovulação. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 168-186.

KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. **Canadian Veterinary Research**, v. 39, p. 107-109, 1998.

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; DROST, M.; BARNUM, D. H.; FINCHER, K. B.; ROBERTS, R. M. Proteins secreted by day 16 conceptuses extended corpus luteum function in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 381-391, 1986.

KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GALINDO, A. D. S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista CFMV**, v. 8, n. 26, p. 27-36, 2002.

MACHADO, R. **Effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and norgestomet on estrus synchronization and fertility in postpartum beef cows**. 1994. 123 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana – Champaign.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BARBOSA, R. T.; DE OLIVEIRA, C. A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 798-804, 2008.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WHATES, D. C. The regulation of interferon- τ production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54 (suppl.), p. 317-328, 1999.

MARQUES, M. O. **Ultra-sonografia ovariana, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embriões submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral**. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MIHM, M; CURRAN, N.; HYTTEL, P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 293-304, 1999.

NEUMANN, A. L.; LUSBY, K. S. The commercial cow-calf program. In: NEUMANN, A. L.; LUSBY, K. S. **Beef cattle**. 8. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986. p. 1-14.

NIASARI-NASLAJI, A.; JILLELLA, D.; FENWICK, D.; KINDER, J. E.; D'OCCHIO, M. J. Estrus synchronization and fertility after the control of formation and regression of the corpus luteum, and emergence of the ovarian dominant follicle in cattle. **Theriogenology**, v. 46, n. 8, p. 1451-1465, 1996.

PETERS, A. R. Embryo mortality in the cow. **Animal Breeding Abstracts**, v. 64, p. 587-598, 1996.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Ovarian response to hcg treatment during the estrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, n. 1, p. 303-8, 1989.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide, Version 6. 4. ed. Cary: SAS Institute, 2000. v. 2, p. 891-1686.

SIANANGAMA, P. C.; RAJAMAHENDRAN, R. Characteristics of corpus luteum formed from the first wave dominant follicle following hCG in cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 977-990, 1996.

SPITZER, J. C. Influences of nutrition on reproduction in beef cattle. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 320.