

GIORGIA THAÍS DA SILVA HAAS

TAXA DE GESTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA EM
RECEPTORAS DE EMBRIÃO BOVINO TRATADAS COM SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA (rbST)

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

H112t
2004

Haas, Giorgia Thaís da Silva, 1980-

Taxa de gestação e concentração sérica de progesterona em receptoras de embrião bovino tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbST) / Giorgia Thaís da Silva Haas. – Viçosa : UFV , 2004.

viii, 38f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 28-37

1. Bovino – Reprodução. 2. Bovino - Inseminação artificial. 3. Somatotropina bovina. 4. Bovino - Transferência de embriões. 5. Ovulação. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 636.208926

GIORGIA THAÍIS DA SILVA HAAS

TAXA DE GESTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROGESTERONA EM
RECEPTORAS DE EMBRIÃO BOVINO TRATADAS COM SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA (rbST)

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

APROVADA: 22 de Dezembro de 2004

Prof. Antonio Bento Mâncio

Dr. Carlos Antônio de C. Fernandes
(Conselheiro)

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Conselheiro)

Prof. José Domingos Guimarães

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

A inteligência sem amor, te faz perverso.
A justiça sem amor, te faz implacável.
A diplomacia sem amor, te faz hipócrita.
O êxito sem amor, te faz arrogante.
A riqueza sem amor, te faz avaro.
A docilidade sem amor, te faz servil.
A pobreza sem amor, te faz orgulhoso.
A beleza sem amor, te faz ridículo.
A autoridade sem amor, te faz tirano.
O trabalho sem amor, te faz escravo.
A simplicidade sem amor, te deprecia.
A oração sem amor, te faz introvertido.
A lei sem amor, te escraviza.
A política sem amor, te deixa egoísta.
A fé sem amor, te deixa fanático.
A cruz sem amor se converte em tortura.
A vida sem amor... não tem sentido.

(Madre Tereza de Calcutá)

“Dedico com todo amor do mundo aos meus pais, Antônio e Marli, as minhas queridas irmãs, Priscilla e Gheysa e aos meus amorosos avós, Guilherme (*in memoriam*) e Georgina, os quais foram imprescindíveis para a conclusão de mais uma etapa de minha vida”

AGRADECIMENTO

À Deus e Jesus Cristo pela vida, pela fé, pelo amor e coragem para que eu pudesse chegar até aqui;

Aos meus queridos pais, Marli Sonete da Silva Haas e Antônio Haas, pela vida, amor, carinho, atenção, credibilidade e principalmente por acreditarem nos meus sonhos;

Às minhas admiráveis irmãs, Priscilla de Cássia e Gheysa Fernanda, pelo amor inesgotável, pelo carinho e a paciência acima de tudo;

À Universidade Federal de Viçosa e Viçosa pela colhida mais que receptiva, da qual levarei lembranças por toda minha vida;

Ao mais que professor, meu amigo e orientador de mestrado, Professor Eduardo Paulino da Costa, pela respeitável e estimável amizade e orientação, pelos ensinamentos, pela credibilidade, atenção e lições de vida;

Ao proprietário e funcionários da Fazenda Água Limpa (Fama - MG), base fundamental para a conclusão deste projeto;

À FAPEMIG pelo auxílio nesta pesquisa;

Ao Dr. Antônio Carlos de Carvalho Fernandes pelo apoio, orientação e ensinamentos na condução e finalização deste experimento;

A Professora Eunice Oba e FMVZ/ UNESP pelo auxílio na realização das análises laboratoriais;

Aos Professores Ciro Alexandre Torres, José Domingos Guimarães e Antônio Bento Mâncio pelas valiosas sugestões e por participarem da banca examinadora;

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, principalmente Seu Nenzinho (Laboratório de Reprodução Animal), Rose e Beth (secretaria de Pós-graduação) pelo auxílio nas tarefas diárias sempre com bom humor e carisma;

Ao meu grande companheiro Hugo Alves Pinheiro pelo amor, dedicação e pelo grande auxílio para a conclusão desta dissertação;

A minha grande amiga de mais uma jornada Thalita Lázaro Leal, companheira das risadas e dos choros, dos tombos e das levantadas, amiga para sempre;

Aos amigos de faculdade Daniele, Cibele, Carol, Juliana, Fábio, Juliano Pompom, Alexandre, Juca, Roberto, Carlão, Lebrão e Giovanni, os quais mesmo longe sempre estavam me apoiando;

Aos amigos de mestrado Marilú, Aline, Juliana, Adolfo, Flávio, Rodrigo, Carol, Amanda e Alessandra pelas trocas de informações e auxílio nos trabalhos de mestrado e da vida;

A todos meus amigos de Viçosa, Soninha, Lind'say, Lohaine, Analívia, Vinícius, Juliana, Maíra, Roberta, Tatiana, Daniel, Ninico, Mosquitinho, Kibe e outros. Para todos vocês que participaram da minha vida: Viçosa não teria sido tão boa quanto foi se vocês não estivessem ao meu lado.

Enfim, à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

Giorgia Thaís da Silva Haas, filha de Antônio Haas e Marli Sonete da Silva Haas, nasceu em Eldorado, Mato Grosso do Sul, em 26 de novembro de 1980.

Em fevereiro de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná (UFPR – *Campus* Palotina) e em março do mesmo ano ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal.

Em 22 de dezembro de 2004, submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Perdas Embrionárias.....	3
2.2. Bases Fisiológicas do Ciclo Estral.....	4
2.3. Reconhecimento Materno da Gestação.....	7
2.4. Corpo Lúteo e Síntese de Progesterona.....	10
2.5. O Uso da rbST como Agente Luteotrófico.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Período, Local e Condições Climáticas.....	16
3.2. Seleção de Doadoras.....	16
3.3. Superovulação e Inseminação das Doadoras.....	17
3.4. Coleta, Manipulação e Avaliação dos Embriões.....	17
3.5. Seleção de Receptoras.....	18
3.6. Grupos Experimentais.....	18
3.7. Inovulação dos Embriões.....	19
3.8. Avaliação da Concentração Sérica de Progesterona.....	19
3.9. Diagnóstico de Gestação.....	20
3.10. Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Taxa de Gestação.....	21
4.2. Concentração Sérica de Progesterona.....	24
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
7. APÊNDICE.....	38

RESUMO

HAAS, Giorgia Thaís da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2004. **Taxa de gestação e concentração sérica de progesterona em receptoras de embrião bovino tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbST).** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Conselheiros: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes e Ciro Alexandre Alves Torres

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de gestação e concentração sérica de progesterona, em novilhas receptoras de embrião, tratadas com dose única de rbST. Foram selecionadas 52 novilhas como receptoras, distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos (T1 e T2), onde T1 corresponde a 22 novilhas que não receberam rbST (controle), e T2 a 30 novilhas que receberam 250 mg de rbST por via subcutânea, na fossa ísqueo-retal, durante o estro. As novilhas de ambos tratamentos foram inovuladas com embriões recém coletados entre o sexto e oitavo dia do ciclo estral. No momento da transferência dos embriões, coletou-se sangue da veia ou artéria coccígea para análise da concentração sérica de progesterona pela técnica de radioimunoensaio. A taxa de gestação foi determinada por ultra-som, 28 dias após a detecção do estro das receptoras. Observou-se um total de 14 novilhas gestantes (46,6%) nos animais do tratamento 2 e 11 novilhas gestantes nos animais do tratamento 1. Nenhum efeito ($P>0,05$) foi evidenciado com o uso da rbST sobre a taxa de gestação. A concentração média de progesterona no dia da inovulação dos embriões foi de $1,71 \pm 0,74$ ng/mL para o grupo de animais do T1 (Controle) e de $1,48 \pm 0,72$ ng/mL para o grupo de animais do T2 (rbST), não sendo observado diferença ($P<0,05$). Concluiu-se que a aplicação de 250 mg de rbST, em novilhas receptoras de embrião na detecção de estro, não afetou a concentração sérica de progesterona, nem tampouco a taxa de gestação.

ABSTRACT

HAAS, Giorgia Thaís da Silva, M.S., Federal University of Viçosa, december 2004.
Pregnancy rate and concentration progesterone in recipient embryo bovine treated with recombinant bovine somatotropin (rbST). Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee members: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes and Ciro Alexandre Alves Torres.

The purpose of this work was to evaluate the effects of rbST on the gestation rate and in the endogenous progesterone concentrations in embryo recipient heifers. Fifty two recipients were selected randomly and allocated in two treatments: (i) The first (T1) - 22 heifers with no application of rbST (Control treatment); (ii) and the second one with 30 heifers, were treated with a single subcutaneous injection of 250 mg rbST (rbST treatment), applied at detected estrus. Heifers from both treatments received fresh embryos, on day six or eight from the detected estrus. At the same time, blood samples were collected from the coccygeal vein or artery so as to perform the progesterone analysis using the radioimmunoassay technique. Twenty eight days after detected estrus, heifers were ultrasonically scanned per rectum to determine the pregnancy rate. No significant difference ($P>0.05$) was observed in the pregnancy rate between control (50%) and rbST (46.6%) treated heifers, or in the progesterone concentration, with mean values of 1.71 ± 0.74 ng/mL, and by 1.48 ± 0.72 ng/mL for control and rbST treated animals, respectively. In conclusion, the application of 250 mg rbST, at detected estrus in heifers, was not effective to increases pregnancy rate and progesterone concentration.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária nacional tem amplamente utilizado novas tecnologias com o intuito de aumentar a eficiência produtiva do rebanho. Dentre as tecnologias, a transferência de embriões (TE) têm assumido um papel de destaque nos últimos anos por permitir uma rápida e relativamente simples multiplicação de animais de alto valor genético (Fonseca & Maffili, 2002).

Dentre os principais problemas associados ao avanço da técnica de TE, pode-se citar o alto índice de perda embrionária, que ocorre, principalmente, nas três primeiras semanas de gestação (Sreenan & Diskin, 1987). De fato, observa-se que as taxas de gestação com o uso de embriões oriundos de procedimentos de TE são menores que prenhez concebidas naturalmente (Peterson & Lee, 2003). Considerando-se que a taxa de sobrevivência embrionária pós-transferência de embriões envolve complexas inter-relações entre embrião, ambiente uterino e corpo lúteo (Thatcher et al., 1995), as menores taxas de gestação utilizando-se TE podem estar associadas ao subdesenvolvimento de alguns embriões, à assincronia útero-embrionária e à má qualidade do corpo lúteo (CL) das receptoras (Sreenan & Diskin, 1987). Isto resulta, em última análise, em falhas no mecanismo de reconhecimento materno da gestação (Thatcher et al., 1995). Portanto, maior ênfase à qualidade dos animais receptores de embriões parece ser de grande importância em programas de TE (Fernandes, 1994).

O estabelecimento e a manutenção da gestação, bem como o crescimento embrionário em bovinos, estão correlacionados à habilidade do corpo lúteo (CL) em secretar progesterona (P_4). Qualquer deficiência deste hormônio poderia contribuir para perdas embrionárias (Staples & Hansel, 1961).

A produção de P_4 está relacionada à produção de citocinas trofoblásticas pelo embrião (interferon- γ e fator ativador de plaquetas derivados do embrião) (Kerbler et al., 1997). Estas citocinas, por seu turno, são fundamentais no período de reconhecimento materno da gestação, pois bloqueiam os mecanismos luteolíticos e,

juntamente com a secreção contínua de P₄, promovem a manutenção da gestação (Mann et al., 1995).

A fim de prevenir maiores perdas embrionárias precoces, Lucy et al. (1995) sugerem que o hormônio de crescimento (somatotropina recombinante bovina, rbST) seria capaz de agir em diferentes etapas do processo de luteólise e do reconhecimento materno da gestação, atuando no corpo lúteo, no útero e no embrião.

A administração de somatotropina potencializa a secreção de bST e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-tipo 1) (Bilby et al., 1999). Este processo, de forma direta ou indireta, pode desencadear uma série de eventos, como: acelerar o crescimento do corpo lúteo e a secreção de progesterona (Lucy et al., 1995), estimular a atividade secretória das glândulas endometriais bem como aumentar o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária (Moreira et al., 2002).

A rbST vem sendo amplamente utilizada para promover aumento na produção leiteira e apresenta efeitos na função reprodutiva. O uso de rbST em protocolos de TE tem sido testado tanto em doadoras quanto em receptoras de embrião, porém, apresentando resultados bastante contraditórios. Neste contexto, objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de rbST em novilhas receptoras de embrião, na detecção do estro prévio a TE, sobre a taxa de gestação e concentração sérica de progesterona.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Perdas Embrionárias

O estabelecimento da gestação na vaca envolve uma complexa série de interações entre o embrião, o ambiente uterino e o corpo lúteo. Os principais fatores responsáveis pela sobrevivência do embrião, após a transferência, são intrínsecos ao próprio embrião, adquiridos no útero da doadora ou da receptora ou por meio da manipulação *in vitro*. De uma maneira geral, as maiores perdas embrionárias ocorrem devido a anomalias cromossômicas, o efeito da doadora, a idade e qualidade dos embriões, o método e local da transferência, a sincronia entre a doadora e receptora, o estado nutricional e a concentração sérica de progesterona das receptoras (Sreenan & Diskin, 1987).

A morte embrionária e fetal é reconhecidamente a maior causa de redução da fertilidade na espécie bovina (Diskin & Sreenan, 1980). Considera-se que tanto para novilhas e vacas, as taxas de fertilização e de nascimentos estão, respectivamente, em torno de 90% e 50-55% (Sreenan et al., 2001). Desta forma, estima-se que ocorra em média 40% de perdas embrionárias e fetais, sendo que na técnica de TE, as perdas são muito maiores em relação ao acasalamento natural e inseminação artificial (IA) (Peterson & Lee, 2003).

Analisando o padrão e a extensão das perdas embrionárias e fetais entre os dias 28 e 84 de gestação, Silke et al. (2002) não observaram diferenças entre novilhas e vacas (6,05 e 7,17%, respectivamente), como também não relataram qualquer relação entre as perdas e fatores produtivos (produção leiteira, percentagem de gordura, proteína e lactose no leite) e genéticos. Foi observado que as maiores perdas embrionárias provavelmente ocorreram nos primeiros 28 dias pós IA (Silke et al., 2002).

Dunne et al. (2000) avaliaram a taxa de sobrevivência embrionária e fetal no 14° (por meio de laparotomia), 30° e 270° dias após IA, e observaram taxas de 68, 76, 71,8%, respectivamente, desta forma, nenhuma diferença foi observada indicando que grande parte das perdas embrionárias ocorre ao redor do 14° dia pós IA. Sreenan et al. (2001) consideram que poucos embriões são perdidos imediatamente após a fertilização até o 8° dia de gestação, a maior perda (70-80%) ocorre entre o 8° e o 16° dia, cerca de 10% entre o 16° e o 42° dia e 5-8% do 42° dia até o parto.

Segundo Peterson & Lee (2003), a maior causa para perdas embrionárias está mais relacionada à qualidade da receptora (habilidade de levar a gestação a termo) que a qualidade do embrião. As diferenças na taxa de gestação estão mais relacionadas aos fatores uterinos que aos ovarianos, pois as secreções uterinas são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do embrião (Peterson & Lee, 2003).

Sendo assim, observa-se que a perda embrionária precoce é elevada, e uma taxa de mortalidade alta tem obviamente, grande impacto econômico na bovinocultura, aumentando o intervalo de partos e retardando o progresso genético.

2.2. Bases Fisiológicas do Ciclo Estral

O período médio entre dois estros consecutivos é denominado ciclo estral, o qual possui duração média de 21 dias na espécie bovina (Binelli, 2000). A vaca apresenta em média duas a três ondas de crescimento folicular (Bó et al., 2000). Na primeira onda de crescimento folicular, a fase de crescimento vai desde a emergência até em torno do 8° dia após o estro; a fase estática ocorre entre o 8° e o 10° dia e a fase de regressão ocorre após o 10° dia. Em torno do 10° dia do ciclo estral ocorre à emergência da segunda onda de crescimento folicular e o processo se reinicia (Vasconcelos, 2000). O estrógeno (E₂) produzido pelo FD da última onda de crescimento folicular induz mudanças associadas ao estro e induz o pico de hormônio luteinizante (LH) resultando na ovulação (Binelli, 2000).

Um a três dias após o estro ocorre a emergência da primeira onda de crescimento folicular (Vasconcelos, 2000). Cada onda de crescimento folicular é precedida por um aumento na concentração do hormônio folículo estimulante (FSH) (Stevenson, 1997). Nos dias subsequentes, parte destes folículos cresce de quatro a seis milímetros de diâmetro, sendo que, dois a cinco folículos maiores do grupo continuarão a crescer,

enquanto os outros regridem (Vasconcelos, 2000). Dos primeiros, pelo menos um continua o desenvolvimento, tornando-se o folículo dominante (FD), principal responsável pela secreção crescente de estradiol (Binelli, 2000).

Após a ovulação forma-se o corpo lúteo (CL), que se desenvolve rapidamente secretando quantidades crescentes de P_4 atingindo o pico máximo de produção ao redor do dia 10 do ciclo estral (Stevenson, 1997). Por volta do décimo sexto dia do ciclo estral, o processo de luteólise culmina com a regressão do CL e a conseqüente queda das concentrações plasmáticas da P_4 (Binelli, 2000), conseqüentemente ocorre aumento na frequência dos pulsos de LH, o que leva à ovulação do FD (Stevenson, 1997). No entanto, enquanto o corpo lúteo (CL) estiver ativo (durante a fase lútea e durante a gestação), ou seja, produzindo progesterona (P_4), ocorre um *feedback* negativo da P_4 sobre a secreção de LH, não ocorrendo, desta forma, a ovulação (Bó et al., 2000).

Em ciclos estrais normais, se a regressão do CL ocorrer enquanto o FD da segunda onda continua funcional (fase de crescimento ou estática), o FD será o ovulatório (ciclo estral com duas ondas). No entanto, se o folículo já tiver iniciado a fase de regressão no momento da luteólise, haverá o crescimento de outro FD da terceira onda de crescimento folicular (Vasconcelos, 2000).

Como salientado anteriormente, para que ocorra a ovulação é necessário a queda na concentração de P_4 em decorrência da regressão do CL, pelo mecanismo chamado de luteólise, cujo agente luteolítico é a prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) (Webb et al., 2002). A $PGF_{2\alpha}$ é secretada da região intercaruncular da superfície do epitélio uterino, por uma série de reações enzimáticas a partir dos fosfolipídeos (Okuda et al., 2002). Resumidamente, os fosfolipídeos pré-sensibilizados pela P_4 são convertidos em diacilglicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3) pela enzima fosfolipase C (Abayasekara & Wathes, 1999). O DAG é convertido em ácido araquidônico pela lipase diacilglicerídeo (Abayasekara & Wathes, 1999). Os fosfolipídeos também são convertidos diretamente em ácido araquidônico pela fosfolipase A2 (Burns et al., 1997). O IP3 causa um aumento do cálcio intra-celular e a ativação da proteína-quinase C (PKC), sendo a principal responsável pela ativação da ciclooxigenase 2 (COX 2) (Burns et al., 1997). A COX 2 converte o ácido araquidônico em PGG_2 , que é então convertida em PGH_2 por uma endoperoxidase, que por sua vez é convertida em $PGF_{2\alpha}$ pela PGF sintase (Okuda et al., 2002). Tanto a $PGF_{2\alpha}$ quanto às outras prostaglandinas produzidas

neste processo são liberadas imediatamente na circulação após a sua biotransformação (Okuda et al., 2002).

O mecanismo de luteólise, causado pela síntese e liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, está muito bem elucidado na espécie ovina. Na ausência de um CL funcional, o E_2 , produzido pelos folículos, estimula a formação de receptores de ocitocina (OT) no endométrio e na hipófise, e também estimula a produção hipofisária de OT. Contudo, durante a fase luteal, a concentração sérica elevada de P_4 reduz a concentração endometrial e hipofisária dos receptores de OT, via inibição da ação do E_2 , além de causar mudanças conformacionais nos receptores de OT. No final da fase lútea, a queda da ação da P_4 em decorrência do *down-regulation* dos seus próprios receptores, tanto no endométrio quanto na hipófise, resulta no retorno da ação do E_2 sobre esses tecidos. O retorno da ação do E_2 estimula a hipófise a secretar pequenas quantidades de OT, por meio de pulsos intermitentes de alta frequência e, simultaneamente ocorre o *up-regulation* dos receptores endometriais de OT (McCraken et al., 1999).

Pequenas doses (sub-luteolíticas) de $\text{PGF}_{2\alpha}$ são liberadas pelo útero devido à interação da OT hipofisária com os receptores endometriais de OT (McCraken et al., 1999). Um pulso inicial de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar a liberação de OT luteal, agindo via receptor de $\text{PGF}_{2\alpha}$ altamente sensível localizado no CL, iniciando, assim, a secreção suplementar de OT de origem luteal a qual irá amplificar a liberação endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ torna-se suficientemente alta para ativar os receptores pouco sensíveis no CL, inibindo a secreção de P_4 e estimulando a liberação adicional de OT luteal, e portanto, reforçando ainda mais a síntese e secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial (Tsai & Wiltbank, 1997). Esse sistema de “alça fechada” continua até que o mecanismo de resposta do receptor de $\text{PGF}_{2\alpha}$ torne-se dessensibilizado, culminando, desta forma, com a liberação suplementar de OT luteal (McCraken et al., 1999).

Acreditava-se que o mecanismo de luteólise na espécie bovina fosse semelhante ao que ocorre na espécie ovina. Contudo, Kotwica et al. (1997) demonstraram que na vaca os mecanismos podem ser diferentes. Estes autores aplicaram oito mg (miligramas) de CAP-527 (antagonista específico da OT) por 30 minutos (lentamente), a cada quatro horas, a partir do 15º dia do ciclo estral até o aparecimento dos primeiros sinais de estro ou até o 22º dia do ciclo. Observou-se que o bloqueio dos receptores de OT não impede a ocorrência da secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nem da luteólise, comparando-se aos

animais controle. Verificaram ainda que, a duração do ciclo estral dos animais tratados foi semelhante a dos animais controle, evidenciando desta forma que, aparentemente na espécie bovina, a OT pode não ser determinante para a luteólise, e sim, como um modulador, regulando a amplitude da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Kotwica et al., 1998).

A atenção voltou-se então para o E_2 , como o principal responsável pela luteólise. Experimentos anteriores já haviam demonstrado sua importância na luteólise: Thatcher et al. (1986) demonstraram que injeções de E_2 no 13º dia do ciclo estral estimulavam a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, levando a luteólise 96 horas após sua aplicação, enquanto que nas novilhas não tratadas, a luteólise demorava 125 horas para ocorrer. Hughes et al. (1987), citado por Binelli (2000), demonstraram que a irradiação dos folículos ovarianos, uma forma reversível de impedir a produção folicular de E_2 , retarda a luteólise e prolonga o ciclo estral. Entretanto, o mecanismo de ação do E_2 no estímulo da secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e na luteólise ainda não está elucidado (Binelli, 2000). Deve ser ainda enfatizado que, além da OT e do E_2 , outros fatores, tais como o $\text{TNF}\alpha$ (fator de necrose tumoral tipo), noradrenalina e PAF (fator ativador de plaquetas) podem estar envolvidos na regulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Okuda et al., 2002).

2.3. Reconhecimento Materno da Gestação

Se o ovócito liberado não for fertilizado, a luteólise irá ocorrer e o ciclo estral irá se repetir. Contudo, se o ovócito for fertilizado, o processo luteolítico tem que ser bloqueado (ao redor do dia 16 do ciclo estral) para que a gestação seja mantida. Reconhece-se então um período crítico no ciclo reprodutivo da vaca, definido entre os dias 15 e 17 do ciclo estral, pois neste período a vaca deve ajustar sua fisiologia apropriadamente, saindo de um estado de ciclicidade para um estado gestacional (o processo de reconhecimento materno da gestação). Para que isso ocorra, a luteólise deve ser bloqueada, no entanto, depende da habilidade do embrião em enviar sinais anti-luteolíticos e da capacidade do endométrio em responder a estes sinais, impedindo então a produção e liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Binelli, 2000).

O bloqueio dos mecanismos luteolíticos pelos fatores produzidos pelo embrião e a secreção contínua de P_4 luteal promovem o estabelecimento da gestação (Mann et al., 1995). A manutenção da concentração elevada deste hormônio no plasma materno está

relacionada com a habilidade do concepto em secretar fatores essenciais para o reconhecimento da gestação (Kerbler et al., 1997).

Na vaca gestante, as células trofoblásticas embrionárias secretam de forma parácrina o interferon-tau (IFN- τ) no lúmen uterino, entre os dias oito e 10 do ciclo estral, alcançando o pico entre os dias 12-14 na ovelha e 14-17 em bovinos (Wathes & Lamming, 1995). Este fator é o mais importante no reconhecimento materno da gestação em vacas (Thatcher et al, 1997).

Existe uma relação positiva entre a concentração de P_4 e a síntese do IFN- τ (Kerbler et al., 1997). A aplicação intra-uterina de proteína trofoblástica no momento da implantação, diminui a mortalidade embrionária (Martal et al., 1997).

Segundo revisão de Binelli et al. (2000), para que ocorra a manutenção da gestação, o IFN- τ liga-se ao seu receptor específico (IFN- tipo I) localizado nas células epiteliais do endométrio materno, causando a dimerização do receptor, com conseqüente fosforilação de tirosinas kinases da família JAK (*Janus-Kinase*). Desta forma, os receptores fosforilados atraem fatores citoplasmáticos chamados STAR (proteína esteroideogênica regulatória aguda). Os resíduos de tirosina das proteínas STAR são fosforilados pelas JAK e formam um complexo (2º mensageiro) que migra para o núcleo causando a ativação de genes, os quais podem promover a produção de uma série de proteínas (ainda não identificadas) que provavelmente irão atuar em pontos “chaves” da produção de $PGF_{2\alpha}$, tais como: inibindo as enzimas PKC, fosfolipase A2, COX 2 ou inibindo os receptores de OT e E_2 . Outra possibilidade seria que esta ligação poderia causar a repressão de determinados genes, tais como o gene da COX 2. Desta forma, a síntese e liberação de $PGF_{2\alpha}$ é inibida e o CL e a produção de P_4 é mantida, levando, conseqüentemente, à manutenção da gestação (Binelli et al., 2000).

A secreção de INF- pelo trofoblasto induz a síntese de uma proteína com reação cruzada a Ubiquitina (UCPR) pelo endométrio. Entretanto, a sua função ainda não está esclarecida. Sabe-se que, em rebanhos com altas taxas de gestação, as concentrações de INF- e UCPR são superiores a rebanhos com baixa fertilidade (Peterson & Lee, 2003).

Outro fator produzido no início da gestação e que inibe a luteólise é o fator ativador de plaquetas derivado do embrião (EDPAF) (Martal et al., 1997). A secreção do EDPAF ocorre no período de pré-implantação (Battye et al., 1991), estando envolvido em processos reprodutivos, incluindo a fecundação (Roudebush et al., 1990)

e a implantação (Ryan et al., 1990). O EDPAF é um importante sinal para o reconhecimento materno da gestação (Kim & Fortier, 1995), sendo que, sua aplicação adicional, poderia contribuir para a continuação da gestação após a transferência de embriões (O'Neill & Saunders, 1984). A ação deste fator aumenta a concentração plasmática de P_4 , quando infundido no útero de novilhas entre os dias nove e 11 ou 14 e 16 do ciclo estral (Hansel, 1988). Sua produção crônica poderia suprimir a secreção de $PGF_{2\alpha}$ estimulada pela oxitocina (Kim & Fortier, 1995), conforme verificado por Battye et al. (1992) em ovelhas. Este mecanismo poderia ocorrer por meio do bloqueio da PKC, a qual está envolvida no metabolismo do ácido araquidônico, para a produção de $PGF_{2\alpha}$ (Lafrance & Goff, 1990). A progesterona também bloqueia a ação da enzima PAF acetilhidrolase (PAF-AH) produzida pelo endométrio (Ammit & O'Neill, 1997), a qual inativa o PAF secretado pelo embrião (Takashi et al., 1997).

Componentes do sistema IGF-1 também podem ter um importante papel no reconhecimento materno da gestação. Os embriões são parcialmente dependentes do IGF-1 para ter o seu desenvolvimento melhorado e desta forma produzir adequadamente fatores essenciais para sinalizar sua presença ao útero. Além disto, grande quantidade de RNAm para IGF-1 é encontrada no endométrio, no momento do reconhecimento materno da gestação (Lucy et al., 1995).

2.4. Corpo Lúteo e Síntese de Progesterona

O Corpo Lúteo (CL) é um elemento chave para muitos processos reprodutivos incluindo o comprimento do ciclo estral, reconhecimento materno da gestação e sobrevivência embrionária em todas as espécies de mamíferos (Milvae et al., 1996). O CL é composto por células não esteroideogênicas (células endoteliais, células vasculares, fibroblastos, entre outras) e por células esteroideogênicas (pequenas e grandes células luteais), as quais variam em quantidade de acordo com a fase luteal. As pequenas células luteais (PCLs) são derivadas da teca interna do folículo, enquanto as grandes células luteais (GCLs), são primariamente derivadas das células da granulosa e em estágios mais tardios do ciclo estral são desenvolvidas a partir das PCLs (Pate, 1996).

A progesterona, principal hormônio sintetizado pelo corpo lúteo, orquestra os eventos fisiológicos e endócrinos preparando a fêmea para escapar da luteólise e levar a

termo uma gestação. Esta condição ocorre devido a mudanças no ambiente uterino condizente para o crescimento e desenvolvimento do concepto (Geisert et al.,1992).

O substrato utilizado pelas células luteínicas para a síntese de P_4 é o colesterol, sendo que em bovinos, tanto a lipoproteína de alta densidade (HDL) quanto a lipoproteína de baixa densidade (LDL) podem ser utilizadas para este processo (Milvae et al., 1996). Uma vez que o colesterol tenha sido transportado para a matriz mitocondrial, a enzima citocromo P450_{ssc} atua na conversão do colesterol à pregnenolona, a qual, posteriormente, é transportada para o retículo endoplasmático liso (REL), onde a enzima 3- β -hidroxisteróide desidrogenase a converte em progesterona. Após a síntese, a progesterona deixa a célula aparentemente por difusão, não havendo evidências que ela possa ser estocada em altas quantidades no interior do tecido luteal (Niswender et al., 2000).

Segundo Mann & Lamming (1995), o aumento na concentração de P_4 pode ser um fator importante para o aumento da taxa de gestação, pois maiores quantidades desse esteróide poderiam exercer função luteoprotetora e prevenir a regressão luteal. Peters (1996) afirma que a manutenção da secreção de progesterona por um corpo lúteo viável é imprescindível no início da gestação e, provavelmente, a luteólise prematura é uma das causas principais de morte embrionária. Além disso, a manutenção do nível elevado desse hormônio no plasma materno está relacionada com a habilidade do concepto em secretar fatores essenciais para o reconhecimento da gestação (Kerbler et al., 1997). Em função disso, é provável que, se um embrião não receber suficiente estímulo mediado pela progesterona o seu desenvolvimento será prejudicado, possuindo menos condições de produzir os interferons trofoblásticos necessários para bloquear o processo luteolítico e manter a gestação (Mann et al., 1995).

Durante os estágios iniciais da gestação, a progesterona estimula secreções endometriais necessárias para o desenvolvimento do embrião e controla o desenvolvimento dos mecanismos luteolíticos. Em animais acasalados que subseqüentemente sofrem luteólise, as concentrações de P_4 são menores durante a segunda metade da fase luteal que em vacas gestantes (Mann & Lamming, 1995). Estes achados sugerem que as concentrações plasmáticas de P_4 podem ser um fator vital na determinação do sucesso ou falha da gestação (Santos et al., 2004).

Segundo Wathes & Lamming (1995) as concentrações plasmáticas de P_4 iniciam seu declínio por volta do 14^o-15^o dia, ao contrário das concentrações de PGF₂ e oxitocina as quais começam a elevar-se causando luteólise e retorno do animal ao estro.

A elevação das concentrações plasmáticas de P_4 neste período, poderia ser uma estratégia para aumentar a possibilidade de estabelecimento e manutenção da gestação, pois corrigiria uma assincronia hormonal entre o ambiente uterino e os fatores endócrinos necessários para o desenvolvimento do embrião (Thatcher et al., 1994).

Muitas pesquisas tem sido realizadas com o intuito de avaliar a concentração de P_4 com a subsequente taxa de gestação. Northey et al. (1985) ao avaliarem a concentração de progesterona no dia da transferência de embriões observaram que receptoras que se tornaram gestantes possuíam concentração de P_4 superior a não gestantes ($4,16 \pm 0,26$ e $3,25 \pm 0,29$ ng/ml, respectivamente). No entanto, Hasler et al. (1980) em um estudo envolvendo 528 receptoras de embrião, não obtiveram diferenças na concentração plasmática de P_4 no dia da inovulação embrionária em animais gestantes ou não. Corroborando, Spell et al. (2001) observaram que a concentração plasmática de P_4 no momento da transferência de embriões foi semelhante entre receptoras gestantes ou não. Além disto, os autores reportaram que a concentração de P_4 no momento da TE não é preditiva da subsequente taxa de gestação, pois encontraram valores de P_4 bastante flutuantes entre receptoras gestantes, variando entre 0,58 a 16 ng/ml.

Segundo Staples & Hansel (1961), para o desenvolvimento embrionário proceder normalmente, as concentrações de P_4 deveriam estar em patamares limiares ou adequados, significando que, em rebanhos de fertilidade normal, desde que as concentrações de P_4 atinjam tais patamares, incrementos nas concentrações desse hormônio podem não ter efeitos significativos sobre a taxa de gestação.

2.5. O Uso da rbST como Agente Luteotrófico

A somatotropina (ST) ou hormônio de crescimento (GH) é um hormônio proteico sintetizado pelas células acidófilas (somatotróficas) da parte distal da hipófise anterior, após o estímulo do GHRH (hormônio liberador de GH), e inibido pela somatostatina (fator inibidor de GH), ambos produzidos pelo hipotálamo. Após sua síntese, a ST é transportada pelo sangue para vários órgãos corporais aonde exerce seu efeito biológico (Bauman, 1992). Sua função clássica é a regulação e diferenciação de vários tipos celulares e controle do anabolismo de órgãos e tecidos (Bauman, 1999).

Na década de 70, o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, possibilitou a produção em larga escala de moléculas de somatotropina recombinante bovina (rbST) em uma forma altamente purificada, permitindo assim, a identificação e o melhor conhecimento de seus efeitos fisiológicos (Prosser & Mepham, 1990). Desta forma, uma das descobertas mais estudadas e discutidas é a habilidade da rbST em aumentar em até 37% a produção leiteira em ruminantes (Baldi, 1999).

Os efeitos da somatotropina nos tecidos animais vão além das glândulas mamárias, pois trata-se de um fator de crescimento endócrino capaz de afetar vários tecidos, inclusive os que influenciam a reprodução (Bauman, 1999). O uso da rbST em vacas leiteiras tem sido associado com diminuição da eficiência reprodutiva, como o aumento do número de dias abertos e redução da frequência do estro comportamental (Santos et al., 2004). No entanto há relação antagônica entre produção leiteira e a reprodução, desta forma, não é de se surpreender que a rbST provoque redução na taxa de prenhez (Lucy, 2001). Em contrapartida, efeitos benéficos na performance reprodutiva são observados com a utilização da rbST em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Santos et al., 2004), bem como, a utilização em receptoras de embrião com aumento na taxa de gestação (Moreira et al., 2002).

A incidência de parto gemelar em vacas submetidas ao tratamento com rbST, sugeriu o papel desse hormônio no controle do crescimento e desenvolvimento folicular ovariano na vaca (Butterwick et al., 1988). Este fato é suportado pelo aumento de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo- 1) em gestações gemelares, sendo esse peptídeo, um mediador da ação do hormônio de crescimento e regulador da função local ovariana (Adashi et al., 1985).

Como visto, o eixo somatotrópico possui papel importante no processo reprodutivo, sendo o fígado o principal sítio para ação da somatotropina (Liebermann & Schams, 1994), levando a um aumento na expressão do IGF-1, o qual propaga-se para estimular inúmeros processos fisiológicos e metabólicos (Bauman, 1999).

A rbST pode melhorar a fertilidade por meio de diversos mecanismos, os quais ainda não estão totalmente elucidados (Lucy et al., 1995). A rbST potencializa a secreção de bST e IGF-1 desencadeando uma cascata de eventos (Bilby et al., 1999) que de forma direta ou indireta, pode acelerar o crescimento do corpo lúteo e a secreção de progesterona durante a fase luteínica do ciclo estral (Lucy et al., 1995); aumenta a população de folículos antrais pequenos (Pavlok et al., 1996); estimula a maturação de

oócitos (Izadyar et al., 2000) e aumenta a taxa de fertilização (Izadyar et al., 1996). Além disto, reduz as concentrações séricas de estradiol ao redor do 17º dia do ciclo estral (Lucy et al., 1994); atenua a produção de PGF₂, por modular a expressão da fosfolipase A2 e ciclooxigenase-2, e aumenta o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária (Moreira et al., 2000). A somatotropina também parece estimular a atividade secretória das glândulas endometriais (Moreira et al, 2002; Thatcher et al., 2001) levando a melhoria no desenvolvimento embrionário e conseqüente incremento na taxa de gestação (Wathes et al., 1998).

O sítio de maior concentração de receptores para bST (Lucy et al., 1994) e IGF-1 (Pate, 1996) encontra-se no CL quando comparado a outros tecidos reprodutivos como útero, oviduto e folículos (Lucy et al., 1994), o que pode indicar que este pode ser alvo para ação direta e indireta da bST (Lucy et al, 1993). Liebermann & Schams (1994) observaram, sob condições *in vitro*, a atuação direta da bST na função secretória do corpo lúteo microdialisado, especificamente, durante os estágios iniciais da fase luteal.

No CL uma maior quantidade de receptores para bST encontra-se nas grandes células luteais (Lucy et al., 1993), sendo tal fato confirmado *in vitro* pelo aumento da produção de oxitocina por estas células quando estimuladas pela bST (Fields et al., 1992). Adicionalmente, a bST pode influenciar indiretamente a função luteal pelo aumento da expressão de IGF-I, o qual estimula a secreção de progesterona (Pate, 1996), além de inibir a morte celular, permitindo a manutenção do peso luteal (Lucy et al.,1993). De acordo com Veldhuis et al. (1986), o IGF-1 possui um papel importante no aumento da captação e absorção de lipoproteínas e na esteroidogênese da célula da granulosa e luteal, estimulando, dessa forma, a síntese de P₄.

A ação estimulatória da rbST no CL pode ocorrer se o tratamento coincidir com o início do desenvolvimento do CL, pois seu efeito está relacionado a mudanças celulares levando a um remodelamento nas células com aumento do número das grandes células luteais (Lucy et al.,1994). O mecanismo para explicar tais acontecimentos ainda não está totalmente descoberto, possivelmente, pode ser devido a um aumento na diferenciação das células da granulosa, efeito direto nas grandes células luteais ou aumento da diferenciação de pequenas para grandes células luteais (Lucy et al., 1995). O aumento na concentração de P₄ pode ocorrer tanto por um aumento no peso do CL quanto pela ação da IGF-1 em estimular a esteroidogênese (Lucy et al., 1995).

A somatotropina também pode causar um retardo na regressão do CL durante a luteólise devido à diminuição das pequenas células luteais, as quais parecem iniciar o processo de luteólise (Lucy et al., 1995) e pela diminuição da secreção de estradiol do folículo pré-ovulatório retardando a luteólise por diminuir a liberação de PGF₂ uterina (Moreira et al., 2002). No entanto, De La Sota et al. (1993) demonstraram que a regressão do CL, após a administração de PGF₂, não foi afetada pelo tratamento com rbST, sugerindo que bST pode não apresentar uma atividade de proteção ao CL. Contudo, atenuação da síntese de PGF₂ no momento de reconhecimento materno da gestação pode ser um dos fatores responsáveis pelo incremento na taxa de gestação obtidos com a utilização de somatotropina (Moreira et al., 2002). O tratamento com rbST favorece respostas antiluteolíticas, uma vez que o RNAm das PGES aumenta tanto em vacas cíclicas quanto em gestantes, enquanto que o RNAm das PGFS diminui no tecido endometrial das vacas gestantes tratadas com rbST (Thatcher et al., 2004).

Outro local para ação da bST e IGF-1 é o embrião (Izadyar et al., 2000). A utilização do hormônio de crescimento, IGF-1 ou ambos, em cultura de células embrionária de bovinos, acelera o desenvolvimento embrionário, no oitavo dia após a fertilização, bem como aumenta o número de células por embrião, resultando em maior secreção de interferon-tau (Mann & Lamming, 2001) no momento do reconhecimento materno da gestação (Binelli et al., 2001). O aumento no desenvolvimento embrionário ocorre devido ao fato da bST estimular a proliferação e/ou diferenciação das células, bem como, modular o seu metabolismo por aumentar o transporte de glicose. Assim, aumento da concentração plasmática destes hormônios pode resultar em altas concentrações destes dentro do oviduto e endométrio, as quais podem estimular o desenvolvimento embrionário (Palma et al., 1997). O IGF-1 também pode regular a atividade secretória das glândulas endometriais, melhorando, assim, o ambiente uterino em sustentar uma gestação (Wathes et al., 1998).

Apesar de haver poucos receptores para rbST nos folículos, Gong et al. (1991) evidenciaram aumento quantitativo nestes, quando novilhas foram tratadas com rbST, o que pode estar relacionado a um efeito indireto causado pelo aumento do IGF-1 no sangue e fluido folicular. A presença de IGF-1 no fluido folicular e sua produção pelas células da granulosa implicam na regulação do folículo ovariano. Desta forma, a bST indiretamente pode aumentar o número de folículos menor que nove milímetros de diâmetro e influenciar o intervalo entre ondas foliculares, pois acelera a emergência da segunda onda folicular resultando em alta incidência de ciclos com 3 ondas seguindo a

inseminação, o qual está relacionado com aumento da taxa de concepção (Kirby et al., 1997). De acordo com Gong et al (1994) a bST age sinergicamente com o FSH, em promover a biossíntese de progesterona e estrógeno.

Baseado no exposto, o objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos da aplicação de 250 mg de rbST em novilhas receptoras de embrião, na detecção do estro prévio a TE, sobre a taxa de gestação e concentração sérica de progesterona.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Período, Local e Condições Climáticas

O presente trabalho foi realizado no período de 10 de Fevereiro a 21 de junho de 2004, na Fazenda Água Limpa, município de Fama, Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. Apresenta latitude sul 21° 25' 45'', longitude oeste 45° 56'50'' e altitude 882m. Segundo a classificação Köeppen, o clima é considerado CWA (temperatura moderada com verão quente e chuvoso), com temperaturas médias anuais entre 21-23°C e regime de chuvas com média de 1600 mm/ano.

3.2. Doadoras

Foram utilizadas 12 vacas como doadoras de embriões, sendo quatro da raça Simental e oito da raça Red Angus, com peso corporal acima de 500 Kg. Selecionou-se animais que apresentaram ciclos estrais com intervalos regulares (21 ± 3 dias) e clinicamente normais ao exame ginecológico (palpação transretal, ultra-sonografia e vaginoscopia). Os animais receberam a mesma alimentação durante todo o período experimental, visando um balanço energético positivo segundo o NRC (1996) e manutenção de um escore corporal de três a quatro (numa escala de um a cinco, segundo Ferreira, 1990). Os animais foram mantidos em piquetes, na presença de um rufião, para o auxílio na detecção de estro, o qual foi observado duas vezes ao dia, durante 30 minutos. A condição adotada para se considerar o animal em estro foi o reflexo de imobilidade.

3.3. Superovulação e Inseminação das Doadoras

Após a constatação de ciclo estral regular, os animais receberam, em dia pré-estabelecido, um implante intravaginal de progesterona (CIDR®–Pfizer). No dia seguinte, aplicou-se um análogo de GnRH, 0,1 mg de acetato de busserelina (Conceptal®–Intervet), visando à eliminação de um possível folículo dominante e o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular.

Após quatro dias da aplicação do análogo do GnRH iniciou-se a superovulação. Adotou-se oito doses decrescentes, em intervalos de 12 horas, perfazendo um total de 200 UI (NIH-FSH-S1) de FSH (Folltropin-V® Vethrepharm Inc) para estimulação. A luteólise foi induzida com 0,5 mg de Cloprostenol sódico (Ciosin®–Coopers) no momento da 7ª aplicação de FSH. Concomitante a 8ª aplicação, removeu-se o implante de progesterona. Após a detecção do estro, foram realizadas duas inseminações, a primeira entre 10 a 12 horas e a segunda entre 20 e 24 horas após o início do estro.

3.4. Coleta, Manipulação e Avaliação dos Embriões

Os embriões foram coletados pelo método não cirúrgico, sete dias após o início do estro das doadoras, conforme descrito por Fernandes (1994). No laboratório da própria fazenda, os embriões foram rastreados com o auxílio de um microscópio estereoscópico, com aumento de 15 vezes, e, uma vez identificados, foram transferidos para outra placa contendo solução de manipulação (Holding Solution® ICP-Emcare). Posteriormente, foram classificados, no aumento de 80X, quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade, segundo Lindner & Wright (1983) e então envasados em palhetas de 0,25 mL em meio PBS (tampão salina fosfato) de Dulbecco & Vogt, modificado por Whittingham (1971). Os embriões permaneceram ao abrigo de luz solar e ventos até o momento da inovulação.

Após o procedimento de coleta dos embriões, as doadoras receberam 0,5 mg de cloprostenol sódico visando a regressão dos corpos lúteos e o retorno à atividade ovariana normal.

3.5. Receptoras

Foram utilizadas 52 novilhas mestiças como receptoras de embrião, com peso vivo superior a 350 kg e escore corporal superior ou igual a três, numa escala de zero a cinco (Ferreira, 1990). Durante todo período experimental, os animais foram mantidos em piquetes de capim *Brachiaria brizanta* com suplementação mineral e água à vontade.

As receptoras incluídas no experimento foram selecionadas por meio de exame ginecológico (palpação via transretal e vaginoscopia) e manifestação de um ciclo estral regular, ou seja, duas manifestações de estro com intervalo de 21 ± 3 dias.

O estro foi induzido por meio da aplicação de um agente luteolítico (0,5 mg cloprostenol sódico – Ciosin®–Coopers) nas novilhas que se encontravam, no dia da aplicação, entre os dias sete e 17 do ciclo estral. O cloprostenol foi injetado nas receptoras 24 horas antes de sua aplicação nas doadoras durante o processo de superovulação das doadoras. Este procedimento visa maior sincronização do estro, visto que, segundo Fernandes (2000) as doadoras superovuladas manifestam o estro cerca de 22 horas antes das receptoras.

A detecção do estro foi realizada visualmente duas vezes ao dia, durante 30 minutos, com auxílio de rufiões, na proporção de um rufião para 25 fêmeas. A condição adotada para se considerar o animal em estro foi o reflexo de imobilidade. As receptoras que manifestaram estro 24 horas antes e até 24 horas após as doadoras foram consideradas sincronizadas e utilizadas para inovulação do embrião.

3.6. Animais Experimentais

As receptoras de embrião foram divididas aleatoriamente em dois tratamentos experimentais:

Tratamento 1 (**Controle**): 22 novilhas receptoras foram inovuladas com embrião recém coletado, sem qualquer tratamento prévio.

Tratamento 2 (**rbST**): 30 novilhas receptoras foram tratadas com 250 mg de rbST (Somatotropina Recombinante Bovina - Boostin® - Coopers), na detecção do

estro, pela via subcutânea na fossa ísqueo-retal, e inovuladas com embrião recém-coletado.

3.7. Inovulação dos Embriões

Adotou-se o método transcervical (ou não cirúrgico) de inovulação uterina. Após a palheta ter sido montada no aplicador (Hannover®), este foi revestido com camisa sanitária (Sanitarie Chemise-IMV®) a qual foi rompida após a passagem no primeiro anel cervical. As inovulações foram realizadas no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário que possuía o corpo lúteo.

Foram inovulados embriões com qualidade I, II e III e que estavam em estágio de desenvolvimento de mórula até blastocisto expandido (Apêndice). No dia da transferência dos embriões, as receptoras foram examinadas via palpação transretal para determinação do ovário que possuía o corpo lúteo e avaliação do tônus da musculatura uterina, selecionando-se apenas receptoras com tônus flácido.

3.8. Concentração de Progesterona Sérica

As coletas de sangue para análise de progesterona foram realizadas no dia da inovulação dos embriões, pela punção da veia ou artéria coccígea, em tubos de 10 mL, vacuolizados, sem anticoagulante, e posteriormente, estocados à temperatura de 5 a 8°C, até a centrifugação. Num período máximo de 24 horas as amostras foram centrifugadas a 1500 G por 5 minutos para completa separação do soro, que foi estocado em microtubos (*eppendorfs*), à -18°C, para posterior análise. A análise de progesterona sérica foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), utilizando-se o kit comercial de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida (Coat-a-count progesterone kit, DPC, Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA).

3.9. Diagnóstico de Gestação

Foram realizados diagnósticos de gestação, a partir de 28 dias após a detecção do estro das receptoras, por meio de exame ultra-sonográfico (Pie Medical, modelo Scanner 100 Falco), o qual opera com um sistema de varredura linear em tempo real, acoplado a um transdutor para avaliação endo-retal bifrequencial 6/8 Mhz.

3.10. Análise Estatística

Para análise estatística da taxa de gestação, os dados foram arranjados em tabelas de contingências e analisados pelo teste de Qui-quadrado, a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

Os dados sobre a concentração de progesterona sérica foram submetidos aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochram e Bartlet) e, posteriormente, à análise de variância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Taxa de Gestação

No grupo rbST, constituído de 30 receptoras de embrião, observou-se um total de 14 novilhas gestantes, correspondendo a uma taxa de gestação de 46,6%. Resultado semelhante foi obtido para os animais controle, cuja taxa de gestação foi de 50%. Portanto, a somatotropina recombinante bovina não aumentou a taxa de gestação (Tabela 01, $P > 0,05$).

Em outros trabalhos, a dose de rbST influencia a concentração de bST e IGF-1 e, conseqüentemente a taxa de gestação (Bilby et al., 1999). Incrementos na taxa de gestação foram obtidos com a administração de 500 mg de rbST no estro de fêmeas bovinas (Moreira et al., 2000; Moreira et al., 2002), provavelmente, em resposta ao aumento na concentração sérica de bST e IGF-1 (Bilby et al. 1999). Uma maior concentração sérica de bST e IGF-1 foi também observada após a aplicação de 167 ou 200 mg de rbST em novilhas e em vacas lactantes e não-lactantes (Bilby et al. 1999).

Nesse contexto, é provável que a dose de 250 mg de rbST utilizada nesse experimento tenha sido suficiente para promover aumento na concentração de IGF-1e da somatotropina, sem no entanto, causar efeito na taxa de gestação (Tabela 01). De fato, a utilização de dose reduzida de rbST (167 mg) pode proporcionar incrementos em bST e IGF-1 sem resultar em aumento na taxa de gestação, uma vez que, esses hormônios podem não alcançar o lúmen uterino, onde os embriões encontram-se em desenvolvimento (Bilby et al. 1999).

Sabe-se ainda que o incremento na concentração sérica de IGF-1 varia com a dose de rbST utilizada, visto que a aplicação de 500 mg de rbST resulta em maior produção de IGF-1 que aquela alcançada com o uso de 200 mg rbST (Bilby et al. 1999). Portanto, a produção de IGF-1, estimulada pela aplicação de reduzidas concentrações de rbST, podem ser insuficientes para promover tanto o desenvolvimento embrionário quanto a secreção das

Tabela 01. Número de animais e taxa de gestação em receptoras de embrião tratadas ou não com 250 mg de rbST no estro

Tratamentos	N	Gestantes	Não Gestantes	Gestação (%)*
Controle	22	11	11	50 ^a
rbST	30	14	16	46,6 ^a

* Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ($P>0,05$)

glândulas endometriais, não ocasionando o aumento da taxa de gestação esperada (Moreira et al., 2002).

Ainda que a dose de rbST aplicada tenha resultado em um possível incremento em bST e IGF-1, a ausência de uma resposta positiva na taxa de gestação pode ter sido influenciada pela utilização de novilhas.

Embora estudos comparando diferentes categorias animais submetidas a uma mesma dose de rbST não tenham sido conduzidos até o momento, experimentos utilizando-se doses elevadas de rbST, portanto não limitantes no que diz respeito a uma possível elevação na concentração sérica de bST e IGF-1, tem sido conduzidos. Como exemplo, a aplicação de 25 mg/dia de rbST do estro até o décimo sexto dia do ciclo estral em vacas lactantes resultou em aumento de 12,5% na taxa de gestação (Lucy et al., 1995). Em adição, aumento na taxa de gestação foi também observado em vacas lactantes tratadas com 500 mg de rbST no estro (Moreira et al., 2002). Entretanto, resultados não significativos na taxa de gestação foram obtidos com a aplicação de 500 mg de rbST em novilhas receptoras de embrião (Fonseca, 1999; Hasler et al., 2003), ainda que a aplicação de rbST (41,2 mg/dia) seja ministrada por um período de 150 dias (Grings et al., 1990).

Uma possível explicação para essas diferentes respostas entre categorias animais pode ser devido às diferenças metabólicas e fisiológicas existentes entre si. No caso de vacas lactantes, que possuem baixa concentração de IGF-1 em decorrência da lactação, a rbST pode resultar em incrementos na concentração de IGF-1, corrigindo, assim, um desequilíbrio endócrino e metabólico causado pela lactação (Thatcher et al., 2004). Em novilhas, as concentrações de IGF-1 são superiores àquelas encontradas em vacas, podendo, dessa forma, não responder à aplicação de rbST de modo satisfatório (Bilby et

al., 1999). Portanto, vacas lactantes podem ser consideradas relativamente mais sensíveis e responsivas ao bST e IGF-1 que novilhas, tendo o desenvolvimento e sobrevivência dos embriões melhorados (Thatcher et al., 2004).

Conforme citado anteriormente, a dose (Bilby et al., 1999) e a categoria animal (Thatcher et al., 2004) podem afetar a taxa de gestação. Dessa forma, devido ao fato de novilhas apresentarem menor resposta à aplicação de rbST (Bilby et al., 1999), parece provável que o tratamento com doses superiores pudessem aumentar o estímulo hormonal aos embriões. No entanto, não há relatos na literatura com a utilização de doses superiores à utilizada neste experimento, aplicadas em novilhas durante o estro.

A ausência de um efeito positivo da rbST na taxa de gestação obtida no presente estudo (Tabela 01) possivelmente não esteja relacionada com a aplicação de rbST em novilhas receptoras de embrião no estro (dia zero do ciclo estral). A aplicação de somatotropina no estro garante concentrações elevadas de bST e IGF-1 durante 14 dias (Bilby et al., 1999). A ação destes hormônios ocorre primeiramente no útero, aumentando as condições uterinas em sustentar uma gestação (Hasler et al., 2003) e, posteriormente, entre o sexto e décimo quarto dia do desenvolvimento do embrião, que é considerado um período crítico (Bilby et al., 1999).

Sendo assim, um tempo superior de exposição do útero a bST e IGF-1, antes da transferência dos embriões (Hasler et al., 2003), em conjunto com a exposição dos embriões aos hormônios, durante o seu período crítico de desenvolvimento (Moreira et al., 2002), são essenciais para proporcionar incremento na taxa de gestação. Desta forma, observa-se que, a administração de rbST em vacas lactantes, durante o estro, garante um ambiente uterino capaz de estimular o desenvolvimento embrionário com conseqüente aumento na taxa de gestação (Moreira et al., 2002). No entanto, a aplicação de rbST em novilhas receptoras de embrião no quinto (Fonseca et al., 1999) e no sétimo (Hasler et al., 1993) dia do ciclo estral parece ser responsável pelos resultados semelhantes na taxa de gestação entre animais tratados ou não com 500 mg de rbST, visto que, o útero, antes da transferência do embrião, provavelmente, foi muito pouco (Fonseca et al., 1999) ou não (Hasler et al. 2003) estimulado pela bST e IGF-1.

Apesar da aplicação de rbST ter sido realizada nos animais em estro, os resultados obtidos da taxa de gestação provavelmente são decorrentes de outros fatores como a dose de 250 mg de rbST administrada e pela categoria de animais utilizada (novilhas) como receptoras de embrião, conforme abordado anteriormente.

Incrementos na taxa de gestação são alcançados administrando-se somatotropina em animais subférteis (Morales-Roura et al.,2001) bem como em mulheres com fertilidade reduzida obtendo-se elevação da taxa de implantação embrionária (Tzeng et al., 1993). Entretanto, a taxa de gestação das novilhas receptoras de embrião está próxima à encontrada por outros pesquisadores (Diniz & Jacomini,1994; Fonseca, 1999) inferindo-se assim a fertilidade normal deste rebanho.

4.2. Concentração de Progesterona Sérica

A concentração de progesterona sérica no dia da transferência de embriões das receptoras está apresentada na Tabela 02. Não houve diferença entre os animais experimentais (teste F, $P > 0,05$), ainda que em valores absolutos a concentração de progesterona sérica dos animais tratados com 250 mg rbST (T2) tenha sido ligeiramente superior aos controles (T1). Além disso, o alto coeficiente de variação observado (Tabela 02) indica a necessidade de um elevado número de repetições para detectar pequenas diferenças entre os animais dos tratamentos. Ressalta-se que, no tratamento rbST, três amostras de sangue foram perdidas por hemólise, diminuindo para 27 o número de amostras.

Embora a administração de 250 mg de rbST não foi capaz de elevar a concentração de progesterona sérica, observou-se que a elevação da concentração deste hormônio tanto *in vitro* (Lieberman & Schams, 1994) quanto *in vivo* (Gallo & Block et al., 1991) foi dose-dependente. Aumento na concentração de progesterona sérica foi obtido com a administração de 500 mg de rbST em vacas, no estro de vacas (Morales-Roura et al., 2001) e com a aplicação de 320 e 640 mg de rbST em vacas lactantes (Gallo & Block, 1991). Já, a administração de uma dose total de 250 mg de rbST em novilhas, com início do tratamento no estro, não aumentou a concentração de progesterona, apesar do aumento numérico absoluto na fase luteal inicial do ciclo estral (Lucy et al., 1994). Desta forma, é possível que doses maiores, as quais causam elevação na concentração de bST e IGF-1 (Bilby et al., 1999), pudessem estimular a

Tabela 02. Concentração sérica de progesterona no dia da inovulação embrionária em receptoras tratadas ou não com rbST.

Tratamentos	N	Progesterona (P₄)* (ng/mL)	Coefficiente de Variação (%)
Controle	22	1,48 ± 0,72a	49
rbST	27	1,71 ± 0,74a	43

* Valores representam a concentração média ± desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$)

síntese de progesterona pelo corpo lúteo, visto que, a administração de dose reduzida de 250 mg não foi suficiente para promover a elevação do hormônio em questão. No entanto, a utilização de dose de 500 mg em novilhas, no quinto dia do ciclo estral, não proporcionou diferenças entre os animais, além do mais, esta mesma dose administrada em novilhas, no terceiro dia do ciclo estral, causou diminuição na concentração de P₄. (Borges et al., 2001). Esta diminuição pode ocorrer devido ao aumento no metabolismo e no fluxo sanguíneo hepático causado pela somatotropina bovina, e com isso, o *clearance* hormonal (Foxcroft et al., 2000).

Outro fator que pode afetar a concentração de progesterona é a categoria animal quando se faz uso de somatotropina (Lucy et al., 1994). A aplicação de 250 mg de rbST em novilhas em estro não aumentou a concentração de progesterona. A ausência de efeitos positivos na concentração de progesterona, com a utilização de novilhas, foi observada nos trabalhos de Fonseca (1999), Gong et al. (1991) e Lucy et al. (1994). Concentrações mais elevadas de progesterona foram encontradas com a utilização de vacas lactantes (Schemm et al., 1990 e Gallo & Block, 1991). A administração de rbST causa uma ação diferenciada da bST e do IGF-1 no ovário de vacas lactantes, cujas capacidades esteroidogênicas encontram-se comprometidas pela lactação (Lucy et al., 1995).

Adicionalmente, Gallo & Block (1991) verificaram que vacas em lactação possuem baixa concentração sérica de IGF-1. Assim, o tratamento com rbST eleva a concentração de IGF-1, que possui papel importante no aumento da captação e absorção de lipoproteínas e na esteroidogênese da célula da granulosa e luteal, estimulando, portanto, a síntese de P₄ (Veldhuis et al., 1986). No entanto, em novilhas, cujos níveis endógenos de IGF-1 são superiores aos de vacas em lactação, aplicações de rbST podem

não surtir efeito devido o limiar de bST e IGF-1 circulante (Lucy et al.,1994) ou até responder negativamente devido a um desequilíbrio endócrino (Borges et al.,2001).

O dia do ciclo estral em que os animais receberam a somatotropina provavelmente não tenha influenciado a concentração de progesterona sérica. (Lucy et al., 1994). A ação estimulatória da bST e IGF-1 ocorre quando o início do tratamento coincide com a formação do corpo lúteo (Lucy et al., 1994). A somatotropina causa mudanças durante o desenvolvimento inicial do corpo lúteo, levando a um remodelamento das células luteais (Lucy et al., 1994) e aumento da esteroidogênese principalmente durante a fase luteal inicial (Schemm et al., 1990; Liebermann & Schams, 1994) e intermediária (Schemm et al., 1990). Desta forma, a aplicação de somatotropina no quinto e sétimo dia do ciclo estral por Fonseca et al. (1999) e Gong et al. (1997), respectivamente, provavelmente não causou efeito sobre o CL formado, explicando, assim, a falta de estímulo na síntese de progesterona.

Embora o início do tratamento com 250 mg de rbST tenha coincidido com o desenvolvimento inicial do CL, ou seja, administrado no estro, a não elevação na concentração de progesterona sérica pode ser decorrente, principalmente, da dose de 250 mg, insuficiente em promover incrementos na síntese e ou liberação de progesterona, e pela utilização de novilhas, visto que, são menos responsivas a somatotropina (Bilby et al., 1999).

5. CONCLUSÃO

A aplicação de 250 mg de rbST em novilhas receptoras de embrião em estro não promove incrementos na concentração sérica de progesterona, tampouco na taxa de gestação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAYASEKARA, D.R.E.; WATHES, D.C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 61, p. 275-287, 1999.
- ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; DERCOLE, A.J.; SVOBODA, M.E.; VAN WIK, J.J. Insuline-like growth factors as intraovarian regulators of granulose cells growth and function. **Endocrinology Reviews**, v. 6, p. 400-420, 1985.
- AMMIT, A.J.; O'NEILL, C. The role of albumin in the release of platelet-activating factor by mouse preimplantation embryos in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 309-318, 1997.
- BALDI, A. Manipulation of milk production and quality by use of somatotropin in dairy ruminants other than cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 131-137, 1999.
- BATTYE, K.M.; O'NEILL, C.; EVANS, G. Evidence that platelet-activating factor supresses uterine oxytocin-induced 13, 14-dihydro-15-ketoprostaglandin F₂ α release and phosphatidylinositol hydrolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 213-219, 1992.
- BATTYE, K.M.; AMMIT, A. J.; O'NEILL, C.; EVANS, G. Production of platelet activating factor by the pre-implantation sheep embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 507-514, 1991.
- BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin and lactation: from science to commercial application. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.101-116, 1999.
- BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.3432-3451, 1992.

- BILBY, C.R.; BADER, J.F.; SAEFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; MURPHY, C.N.; GARVERICK, H.A.; CROOKER, B.A.; LUCY, M.C. Plasma GH, IGF-1, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, v. 51, p. 1285-1296, 1999.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, p. 99-114, 2000.
- BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinâmica folicular ovárica em el bovino. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, p. 12-34, 2000.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA Jr, V.R.; CARVALHO, G.R.; BORGES, J.C. Concentração plasmática de progesterona e metabólitos lipídicos em novilhas mestiças tratadas ou não com hormônio de crescimento e superovuladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p. 1689-1696, 2001.
- BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF₂alpha in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 181-191, 1997.
- BUTTERWICK, R.F.; ROWLINSON, P.; WEEKS, T.E.C.; PARKER, D.S.; ARMSTRONG, D.G. The effect of long-term daily administration of bovine somatotropin on the performance of dairy heifers during their first lactation. **Animal Production**, v. 46, p. 483, 1988.
- DE LA SOTA, R.L.; LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in lactating e nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1002-1013, 1993.
- DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.A. Transferência de embriões bovinos: resultados de 20 coletas. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 32, p. 25, 1994.
- DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers and 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 day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 39-44, 2000.
- FERNANDES, C.A.C. **Imunização ativa com líquido folicular suíno, alterações na fisiologia reprodutiva e resultados de superovulação em vacas e novilhas**. Botucatu, SP: FMVZ, 2000. 134 p. Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2000.
- FERNANDES, C.A.C. **Efeito do Tratamento com FSH Sobre a Taxa de Gestação de Novilhas Mestiças Usadas Como Receptoras de Embrião**. Viçosa, MG: DZO, 1994. 64 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- FERREIRA, A.M. **Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras**. Viçosa, MG: DZO, 1990. 134 p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- FIELDS, M.J.; BARROS, G.M.; WATKINS, W.B.; FIELDS, P.A. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 535-545, 1992.
- FONSECA, J.F. **Efeito da administração de diferentes hormônios no 5.º dia do ciclo estral sobre a formação de corpo lúteo acessório, níveis plasmáticos de progesterona e taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos**. Belo Horizonte, MG: EV, 1999. 104 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- FONSECA, J.F.; MAFFILI, V.V. Transferência de embriões. In: IV JORNADA DE MEDICINA VETERINARIA DA UNIPAR. Umuarama, PR. **Anais...** Umuarama, p. 17-26, 2002.
- FOXCROFT, G.; ALMEIDA, F.; AHERNE, F. Management of the gilt and first parity sow. In: VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS. Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, p. 131-145, 2000
- GALLO, G.F.; BLOCK, E. Effects of recombinant bovine on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 343-353, 1991.

- GEISERT, R.D.; MORGAN, G.L.; SHORT, E.C.; ZAVY, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction and Fertility Development**, v. 4, p. 301-305, 1992.
- GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 91-97, 1997.
- GONG, J.G.; McBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insuline-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 157-167, 1994.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 941-949, 1991.
- GRINGS, E.E.; DE AVILA, D.M.; EGGERT, R.G.; REEVES, J.J. Conception rate, growth, and lactation of dairy heifers treated with recombinant somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 73-77, 1990.
- HANSEL, W. Establishment of pregnancy: regulation of the corpus luteum. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin: p. 61-70, 1988.
- HASLER, J.F.; BILBY, C.R.; COLLIER, R. J.; DENHAM, S.C.; LUCY, M.C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1919, 2003.
- HASLER, J.F.; BOWEN, R.A.; NELSON, L.D. SEIDEL Jr, G.E. Serum progesterone concentration in cows receiving embryo transfers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 71-77, 1980.
- IZADYAR, F.; VAN TOL, H.T.A.; HAGE, W.G.; BEVERS, M.M. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and response to growth hormone addition during *in vitro* development. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p. 247-255, 2000.

- IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 372-377, 1996.
- KERBLER, T.L.; BUHR, M.M.; JORDAN, L.T.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 703-714, 1997.
- KIM, J.J.; FORTIER, M.A. Cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 239-247, 1995.
- KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 273-285, 1997.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; MISZKIEL, G.; OKUDA, K. Oxytocin modulates the pulsatile secretion of prostaglandin F2 α in initiated luteolysis in cattle. **Veterinary Science**, v. 66, p. 1-5, 1998.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; MELIN, P.; STAROSTKA, B. The use of oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 1287-1299, 1997.
- LAFRANCE, M.; GOFF, A.K. Control of bovine uterine prostaglandin F2 α release in vitro. **Biology of Reproduction**, v.42, p. 288-293, 1990.
- LIEBERMAN, J.; SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 243-249, 1994.
- LINDNER, G.M.; WRIGHT Jr., R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v.20, p.407-16, 1983.
- LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1277-1293, 2001.
- LUCY, M.C.; THATCHER, W.W.; COLLIER, R.J.; SIMMEN, F.A.; KO, Y.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 73-80, 1995.

- LUCY, M.C.; CURRAN, T.L.; COLLIER, R.J.; COLE, W.J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. **Theriogenology**, v. 41, p. 561-572, 1994.
- LUCY, M.C.; COLLIER, R.J.; KITCHELL, M.L.; DIBNER, J.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1219-1224, 1993.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Progesterone inhibition of the development of luteolytic signals in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p. 1-5, 1995.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; FRAY, M.D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. **Animal Reproduction Science**, v. 37 p. 121-131, 1995.
- MARTAL, J.; NICOLE, C.; SYLVAINE, C.; HUYNH, L.; LANTIER, F.; HERMIER, P.; HARIDON, R.L.; CHARPIGNY, G.; CHARLIER, M.; CHAOUAT, G. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN τ and other cytokines in early pregnancy. **Reproduction and Fertility Development**, v. 9, p. 355-380, 1997.
- McCRAKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, p.872-891, 1999.
- MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.
- MORALES-ROURA, J.S.; ZARCO, L.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; RODRIGUEZ, G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. **Theriogenology**, v. 55, p. 1831-1841, 2001.

- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1371-1387, 2002.
- MOREIRA, F.; RISCO, C.A.; PIRES, M.F.A.; AMBROSES, J.D.; DROST, M.; THATCHER, W.W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1234-1247, 2000.
- NISWENDER, G. D., JUENGEL, J.L., SILVA, P. J., ROLLYNSON, M. K., MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80 , p.1-29, 2000.
- NORTHEY, D.L.; BARNES, F.L.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Relation of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 23, p. 214, 1985.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7 ed. Washington, DC: National Academy, 1996, 42p.
- OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin F₂ synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 255-264, 2002.
- O'NEILL, C.; SAUNDERS, D.M. Assessment of embryo quality. **The Lancet**, v. 2, p. 1035, 1984.
- PALMA, G.A.; MULLER, M.; BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentration on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 347-353, 1997.
- PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1381-1397, 1996.
- PAVLOK, A.; KOUTECKA, L.; KREJCI, P.; SLAVÍK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 183-192, 1996.
- PETERS, A.R. Embryo mortality in the cow. **Animal Breeding Abstract**, v. 64, n. 8, p. 587-597, 1996.
- PETERSON, A.J.; LEE, R.S-F. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 687-697, 2003.

- PROSSER, C.G.; MEPHAM, T.B. Mechanism of action of bovine somatotropin in increasing milk secretion in dairy ruminants. In: SEJRSEN, K., VESTERGAARD, M.; NEIMANN-SORENSEN, A. **Use of Somatotropin in Livestock Production**. Crown House (Inglaterra): Elsevier Science Publishers Ltd., 1990, 17p.
- ROUDEBUSH, W.E.; MINHAS, B.S.; RIKER, D.D.; PALMER, T.V.; DODSON, M.G.; FORTUNATO, S.J. Platelet activating factor enhances in vitro fertilization of rabbit oocytes. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 163, p. 1670-1673, 1990.
- RYAN, J.P.; SPINKS, N.R.; O'NEILL, C.; WALES, R.G. Implantation potential and fetal viability of mouse embryos cultured in media supplemented with platelet-activating factor. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 309-315, 1990.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 513-535, 2004.
- SCHEMM, S.R.; DEEVER, D.R.; GRIEL Jr, L.C.; MULLER, D. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 815-821, 1990.
- SILKE, V.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A.; BOLAND, M.P.; DILLON, P.; MEE, J.F.; SREENAN, J.M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 1-12, 2002.
- SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.
- SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, p. 287-297, 2001.
- SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v. 27, p. 99-113, 1987.
- SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **Animal Science**, v 1, p. 93-104, 2001.

- STAPLES, R.E.; HANSEL, W.W. Luteal function and embryo survival in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v.44, p. 2040, 1961.
- STEVENSON, J.S. Clinical reproductive physiology of the cow. In: YOUNGQUIST, R.S. **Current Therapy in Large Animal**. Theriogenology. Pennsylvania (EUA): W.B. Saunders Company. p. 257-267, 1997.
- TAKASHI, M.; KATSUHIKO, Y.; JOHN, M.J.; MAYUMI, S.; HIDETAKA, O.; SUSUMU, M.; HIDEHARU, K. Platelet-activating factor (PAF) and PAF acetylhydrolase activity in rat uterus and placenta during the late stages of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 885-890, 1997.
- THATCHER, W.W.; BILBY, T.; GUZELOGLU, A.; STAPLES, C.R. Utilização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) como estratégia para aumentar a taxa de prenhez em vacas leiteiras em lactação. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 2004, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: p. 3-17, 2004.
- THATCHER, W.W., GUZELOGLU, A., MATTOS, R. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.
- THATCHER, W.W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.R.; AMBROSE, J.D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.
- THATCHER, W.W.; MEYER, M.D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 15-28, 1995.
- THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHIMITT, E.J.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 16-30, 1994.
- THATCHER, W.W., TERQUI, M., THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effects of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentration of 15-keto-13, 14-dihydro PGF-2alfa and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, p. 745-756, 1986.
- TSAI, S., WILTBANK, M.C. Prostaglandin F₂ induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1016-1022, 1997.
- TZENG, C.R.; CHIEN, L.N.; CHENG, Y.F.; CHANG, S.R.; CHEN, A.C. Enhancement of IVF pregnancy rates by co-treatment with low-dose growth hormone. **Journal of Assistant Reproduction and Genetic**, v. 10, p. 111, 1993.

- VASCONCELOS, J.L.M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, p. 115-157, 2000.
- VELDHUIS, J.D.E.; NESTLER, J.E.; STRAUSS, J.F.; GWYNE, J.T. Insulin regulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cell. **Endocrinology**, v. 118, p. 242-248, 1986.
- WATHES, D.C.; LAMMING, G.E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 53-57, 1995.
- WATHES, D.C.; REYNOLDS, T.S.; ROBINSON, R.S.; STEVENSON, K.R. Role of insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1778-1789, 1998.
- WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 277-285, 2002.
- WHITTINGHAM, D.G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, p. 7-21, 1971.

7. APÊNDICE

Tabela 01. Distribuição dos embriões quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento de acordo com a raça da doadora no grupo de receptoras controle.

Classificação embrionária	Simental	Red Angus	Total de embriões
Mórula I	1	5	6
Mórula II	3	2	5
Mórula III	5	3	8
Blastocisto inicial I	-	2	2
Blastocisto II	1	-	1
Total de embriões	10	12	22

Tabela 02: Distribuição dos embriões quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento de acordo com a raça da doadora no grupo de receptoras rbST.

Classificação embrionária	Simental	Red Angus	Total de embriões
Mórula I	4	5	9
Mórula II	3	2	5
Mórula III	3	3	6
Blastocisto inicial I	3	-	3
Blastocisto inicial II	4	-	4
Blastocisto I	1	-	1
Blastocisto expandido I	-	1	1
Blastocisto expandido II	1	-	1
Total de embriões	19	11	30