

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RENATA PRESTES ANTONANGELO

**Uso do acetato de deslorelina em protocolos de inseminação artificial em tempo  
fixo (IATF) em vacas leiteiras**

CURITIBA  
2010

RENATA PRESTES ANTONANGELO

**Uso do acetato de deslorelina em protocolos de inseminação artificial em  
tempo fixo (IATF) em vacas leiteiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Linha de pesquisa Reprodução e Melhoramento Genético Animal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Nei Moreira

CURITIBA  
2010

A634

Antonangelo, Renata Prestes

Uso do acetato de deslorelina em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas leiteiras / Renata Prestes Antonangelo. – Curitiba, 2010

71 f. il.

Orientador: Nei Moreira

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2010

1. Bovino de leite – Inseminação artificial. 2. Bovino de leite - Fecundidade. 3. Bovino de leite – Reprodução. I. Moreira, Nei. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 636.2.082



## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "USO DO ACETATO DE DESLORELINA EM PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) EM VACAS LEITEIRAS" apresentada pela Mestranda **RENATA PRESTES ANTONANGELO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79, da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 17 de dezembro de 2010

Professor Dr. Nei Moreira  
Presidente/Orientador

Professor Dr. Romão Romualdo Weiss  
Membro

Professor Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior  
Membro

Professor Dr. Luiz Ernandes Kozicki  
Membro

Aos meus pais Nelson e Margarida

Ao meu marido José Henrique

A minha irmã Hellen

Às primas Madalena e Lúcia

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o resultado do apoio incondicional recebido por todos os meus amigos. Agradeço a todos vocês imensamente, por tudo.

A toda a minha família e ao meu marido.

Ao meu orientador de mestrado, Dr. Nei Moreira, pelo companheirismo, confiança e orientação não só durante a pesquisa, mas também, ao longo destes últimos sete anos em que foi e para sempre será meu professor, dando valiosos conselhos.

Ao integrante do meu comitê de co-orientação, Romildo Romualdo Weiss, por me incentivar a realizar este Mestrado.

Aos Profs. Drs. Luiz Ernandes Kozicki e José Dell' Aqua Junior, por me auxiliarem na projeção e conclusão deste projeto e também, por aceitarem o convite para participar da minha defesa.

Ao professor José Antônio de Freitas, por me ensinar desde a graduação a ter paixão pela pesquisa e por sempre acompanhar meus passos desde então.

A grande amiga "companheira Luciana Ferri Frares", a qual tive a oportunidade de conhecer durante o período do mestrado.

A grande amiga Camila Möers, pelo apoio incondicional na realização de nosso projeto, cedendo seus animais para a pesquisa, e auxiliando na realização do mesmo. A Dona Irene Dalgalo, Alberto e Paulo Petzold e Petersson Maffessoni, por acreditarem na pesquisa e por cederem gentilmente seus animais.

As minha queridas, especiais, amadas e "Mineras" amigas Tâmara Duarte Borges ("Mea-juda") e Janaína Braga ("Gracinha"), com as quais tive o prazer de conviver em Curitiba.

Ao meu grande amigo e professor José Francisco G. Warth, que desde o início deu-me total apoio total, participando de todas as minhas decisões,

uma delas, realizar o mestrado, não desistir e lutar sempre pelos meus objetivos.

As grandes amigas genuinamente "curitibanas" Pâmela Pelizzari e Angela Avi, que me dão suporte desde a graduação e sempre quando precisei me socorreram.

Aos meus amigos Marcelli Joslin e José Paolo Camilo. *Thank's fellows... for all.*

Ao Médico Veterinário Antônio Carlos Queiroz, que cedeu gentilmente seu aparelho de ultrassonografia.

A Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina, onde me formei e ao Programa de Pós Graduação em Ciências veterinárias da Universidade Federal do Paraná, que me ajudaram a conquistar mais uma vitória.

E o mais especial dos agradecimentos, aos animais que participaram do experimento, aos quais devo todo meu carinho, respeito e admiração.

Muito obrigada a todos!



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE QUADROS .....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
<i>ABSTRACT</i> .....	XVII
INTRODUÇÃO .....	18
OBJETIVO GERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA: Aplicações do agonista do GnRH acetato de deslorelina na reprodução de bovinos .....	22
RESUMO .....	23
ABSTRACT .....	23
1. INTRODUÇÃO .....	24
2. EFEITOS DO ACETATO DE DESLORELINA NA ADENOHIPÓFISE .... .....	27
2.1 Secreção de FSH e LH.....	27
3. APLICAÇÕES PRÓ-FERTILIDADE DO ACETATO DE DESLORELINA .....	28
3.1 Indução e restabelecimento da ovulação .....	28
3.2 Involução uterina .....	29
4. APLICAÇÕES ANTI-FERTILIDADE DO ACETATO DE DESLORELINA .....	31
5. CONCLUSÕES .....	32

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 2: EFEITO DO ACETATO DE DESLORELINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS OVARIANOS EM VACAS HOLANDESAS DE ALTA PRODUÇÃO SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE IATF .....</b>	<b>39</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>40</b>
<b><i>ABSTRACT</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3. REVISAO DE LITERATURA .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 DINÂMICA FOLICULAR .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 SINCRONIZAÇÃO COM PGF2<math>\alpha</math> .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 GnRH .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 SINCRONIZAÇÃO COM PROGESTERONA/PROGESTÁGENOS ASSOCIADO AO ESTRADIOL .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 EMPREGO DA ECG EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO NA ESPÉCIE BOVINA .....</b>	<b>51</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Animais e manejo .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Plano experimental .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 Avaliações ultrassonográficas .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Dosagem hormonal .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5 Análises estatísticas .....</b>	<b>57</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>

<b>5.1 Experimento A .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Experimento B .....</b>	<b>60</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química do acetato de deslorelina (adaptado de PADULLA, 2000; MILLAR et al., 2004).....26
- Figura 2 – Estrutura molecular do acetato de deslorelina (<http://www.lookchem.com/Deslorelin/>).....26
- Figura 3 – Diagrama esquemático do Experimento A para o Grupo 1 (G1); D0: animais receberam 2mg de benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-cloprostenol; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.....54
- Figura 4 – Diagrama esquemático do Experimento A para o Grupo 2 (G2); D0: animais receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol + 100 µg de acetato de deslorelina; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.....54
- Figura 5 – Diagrama esquemático do Experimento B para o G1; D0: animais receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina solução aquosa; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.....55
- Figura 6 – Diagrama esquemático do Experimento B para o G2; D0: todos os grupos receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol + 150 µg de acetato de deslorelina liberação controlada; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina solução aquosa; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.....56
- Figura 7 – Efeito do acetato de deslorelina 100 µg em solução aquosa (Média + Desvio padrão), sobre o diâmetro folicular dos Grupos controle e Tratamento, 12 horas após a injeção. (P=0,0001). Letras distintas representam diferença significativa (P<0,05).....58

- Figura 8 – Efeito do tratamento com acetato de deslorelina 150µg em veículo de liberação controlada, sobre o diâmetro do folículo pré-ovulatório de vacas leiteiras de alta produção tratadas e não tratadas com acetato de deslorelina 150 µg. (P=0,0001). Letras distintas representam diferença significativa (P<0,05).....60
- Figura 9 – Taxa de prenhez de vacas leiteiras de alta produção tratadas e não tratadas com acetato de deslorelina 150µg em veículo de liberação controlada. Letras distintas representam diferença significativa (P<0,05).....61
- Figura 10 – Efeito do acetato de deslorelina 150µg em veículo de liberação controlada, em vacas leiteiras de alta produção sobre as concentrações plasmáticas de LH. Letras distintas representam diferença significativa (P<0,05).....62
- Figura 11 – Concentração plasmática de P4 três e sete dias após a ovulação nos grupos controle e tratado com 150 µg de acetato de deslorelina em veículo de liberação controlada. Letras distintas representam diferença significativa (P<0,05).....63

**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 1 – Médias e desvios-padrão da concentração sérica de FSH e LH determinados no dia 8 do protocolo com 0, 3, 6 e 9 horas após a aplicação de 100 µg de deslorelina.....59
- Quadro 2 – Médias e desvios-padrão da concentração sérica de FSH e LH determinados no dia 10 do protocolo com 0, 3, 6 e 9 horas após a aplicação de 100 µg de deslorelina para o grupo G1.....59

**LISTA DE ABREVIATURAS**

IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
P4	Progesterona
E2	Estradiol
BE	Benzoato de estradiol
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
D	Dia
LH	Hormônio luteinizante
IA	Inseminação artificial
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
IGF-1	Fator de crescimento ligado à insulina
bST	Somatotropina bovina
Cl	Corpo lúteo
LHR	Receptor de LH
ECP	Cipionato de estradiol
g	Grama
mL	Mililitro
US	Ultrassom
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
MG	Miligrama
MHz	Mega-Hertz
Ng	Nanograma
DPP	Dias pós-parto
PVE	Período voluntário de espera
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
COX-2	Ciclooxigenase 2
$\mu$ g	Microgramas
®	Marca registrada
$\geq$	Maior ou igual

et al	E colaboradores
%	Porcentagem
UI	Unidade(s) internacional(is)
MAP	Medroxiprogesterona
n	Número
COOPAVEL	Cooperativa agroindustrial de Cascavel
PR	Paraná
±	Mais ou menos
dL	Decilitro
RIA	Radioimunoensaio

|



**RESUMO:** o objetivo do experimento foi testar os efeitos do acetato de deslorelina sobre o aumento dos níveis séricos de FSH, para melhorar o desenvolvimento folicular durante o ciclo estral de vacas com média de 45 dias pós-parto (DPP), bem como, reduzir o período voluntário de espera (PVE) e buscar o aumento das taxas de prenhez. O presente estudo, foi dividido em dois experimentos (A e B). Dois protocolos de sincronização de estro foram comparados em vacas (n=72) da raça Holandesa Preto e Branca no período de março a setembro de 2010, em dois municípios pertencentes à região oeste do Paraná – PR. No experimento A, todos os animais (n = 20), receberam no dia 0 do protocolo, um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona natural e 2 mg de benzoato de estradiol (BE) pela via intramuscular (IM). Após a remoção do implante no dia 8 (D 8), aplicou-se pela via IM em todos os animais, 0,150 mg de d-cloprostenol e após este procedimento, as vacas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: Grupo controle (G1), sem tratamento ao D 8 do protocolo, e o grupo tratamento (G2), no qual se administrou 100 µg de acetato de deslorelina (veículo de liberação rápida) via IM ao D 8. No dia 10, apenas o G1 recebeu a 2ª dose do acetato de deslorelina por via IM, já que os animais G 2 ovularam 24 horas após a primeira aplicação da deslorelina, decidindo-se então, não inseminá-las. Apenas o G1 foi submetido à inseminação artificial em tempo fixo, no dia 11 do protocolo com uma taxa de prenhez de 40% (4-10). No experimento B, vacas (n=52), receberam o mesmo protocolo utilizado para o experimento A citado acima, porém a dose aplicada de acetato de deslorelina no D 8 foi de 150 µg, e em veículo de liberação lenta. Avaliações ultrassonográficas foram realizadas dos dias 0 a 11 do protocolo e amostras de sangue foram coletadas todos os dias em 5 animais de cada grupo para ambos os experimentos. No experimento A, ficou evidente que o acetato de deslorelina foi capaz de promover aumento significativo nas concentrações plasmáticas de FSH (G2=3,4047 ± 0,7943; G1=1,5324 ± 1,1405) e (P=0,0001), porém, ao mesmo tempo, as concentrações plasmáticas de LH aumentaram significativamente (G2=14,2870 ± 6,3588; G1=1,4510 ± 0,3753) e (P=0,001), fazendo com que as vacas do G 2 ovulassem precocemente. No experimento B, o diâmetro do folículo pré-ovulatório apresentou diferenças significativas (G2=1,7222 ± 0,1095; G1=1,5785 ± 0,0896) e (P=0,0001). A taxa de prenhez no experimento B, foi maior no grupo tratamento (57,7 %) em relação ao grupo controle (34,61 %). As concentrações plasmáticas de LH diferiram significativamente entre os tratamentos (G2=15,9065 ± 4,3902; G1=1,5103 ± 0,5750) e (P= 0,02830). Concluímos que no presente trabalho, a dose de 150µg de acetato de deslorelina administrada nos animais do G2, foi capaz de estimular o desenvolvimento folicular, formando folículos pré-ovulatórios maiores e por consequência, melhorando a função lútea uma vez que as concentrações plasmáticas de progesterona foram maiores nos dias 3 e 7 pós-inseminação artificial para o grupo G2 em relação ao G1 (D3 G1=0,8217 ± 0,5000; G2=2,4654 ± 2,7300) e (D7 G1=3,1860 ± 0,8400; G2=4,1833 ± 4,1700) com P=0,0283.

**Palavras-chave:** biotecnologias da reprodução, hormônios, Dinâmica folicular, dosagem hormonal.

**ABSTRACT:** The experiment aimed to test the effects of deslorelin acetate on the rise in serum FSH to enhance follicular development during the estrous cycle of cows averaging 45 days postpartum (DPP), as well as reduce the voluntary waiting period (VWP) and to seek an increase in pregnancy rates. This study was divided into two experiments (A and B). Two estrus synchronization protocols were compared in cows (n = 72) Holstein Black and White in the period from March to September 2010 in two cities from the western region of Paraná - PR. In the experiment, all animals (n = 20) received on day 0 of the protocol, an intravaginal device containing 558 mg of natural progesterone and 2 mg of estradiol benzoate (EB) by intramuscular (IM). After removal of the implant on day 8 (D 8) was applied intramuscularly in all animals, 0,150 mg d-cloprostenol and after this procedure, the cows were randomly divided into two groups: control group (G1) 8 D without treatment protocol and treatment group (G2) in which it was administered 100 mg of deslorelin acetate (vehicle quick release) intramuscularly to D 8. On day 10, only the G1 received a 2nd dose of deslorelin acetate intramuscularly, since animals G 2, ovulated 24 hours after the first injection of deslorelin, deciding then not inseminate them. Only G1 was subjected to fixed-time artificial insemination on the 11th of the protocol with a pregnancy rate of 40% (4-10). In experiment B, cows (n = 52), received the same protocol used for the experiment cited above, but the applied dose of deslorelin acetate on D 8 was 150 mg, and slow delivery vehicle. Ultrasonographic evaluations were performed from days 0-11 of the protocol and blood samples were collected every day from five animals from each group for both experiments. In experiment A, it was evident that the deslorelin acetate was able to promote significant increase in plasma FSH (G2 =  $3.4047 \pm 0.7943$ , G1 =  $1.5324 \pm 1.1405$ ; P = 0.0001), but at the same time, plasma concentrations of LH increased significantly (G2 =  $14.2870 \pm 6.3588$ ,  $1.4510 \pm 0.3753$  = G1; and P = 0.001), causing the cows of the G2 ovulate early. In experiment B, the diameter of the preovulatory follicle showed significant differences (G2 =  $1.7222 \pm 0.1095$ ,  $1.5785 \pm 0.0896$  = G1) and (P = 0.0001). The pregnancy rate in experiment B, was higher in the treatment group (57.7%) compared to the control group (34.61%). Plasma concentrations of LH differed significantly between treatments (G2 =  $15.9065 \pm 4.3902$ ,  $1.5103 \pm 0.5750$  = G1) and (P = 0.02830). We conclude that in the present study, the dose of 150 $\mu$ g administered deslorelin acetate on the G2 was able to stimulate follicular development, forming pre-ovulatory follicles larger and consequently, improving luteal function since the plasma concentrations of progesterone were higher on days 3 and 7 post insemination for G2 compared to G1 (G1 D3 =  $0.8217 \pm 0.50$ , G2 =  $2.4654 \pm 2.73$ ) and (D7 G1 =  $3.1860 \pm 0, 84$ , G2 =  $4.1833 \pm 4.17$ ) with P = 0.0283.

**Keywords:** biotechnology of reproduction, hormones, follicular dynamics, hormonal dosage.

## INTRODUÇÃO

O Brasil exerce grande papel como exportador mundial de leite, sendo considerado o sexto maior produtor do mundo, e tendo grande potencial para crescimento na atividade leiteira durante os próximos anos (FAO, 2009).

A alta produção leiteira ao passar das últimas décadas, decorrente da melhoria nas técnicas de manejo e da seleção genética, está associada a uma menor eficiência reprodutiva que é o mais importante componente do sucesso econômico em rebanhos leiteiros (ROYAL et al., 2000; LOPEZ et al., 2004; SANTOS et al., 2004). Uma das possíveis causas destas falhas reprodutivas em rebanhos de alta produção leiteira é o decréscimo da expressão de cio, que culmina na diminuição na taxa de serviço aumentando assim, o intervalo parto concepção, afetando negativamente o desempenho reprodutivo (PURSLEY et al., 1997).

Para a obtenção de melhores índices reprodutivos frente à alta produção, foram desenvolvidos programas de controle farmacológico do ciclo estral, como a sincronização do desenvolvimento folicular, o controle do corpo lúteo (CL), regressão e sincronização da ovulação para melhorar a taxa de prenhez, permitindo o desenvolvimento e o sucesso da inseminação artificial em tempo fixo que se tornou ferramenta integrante da otimização do manejo reprodutivo em rebanhos leiteiros (PURSLEY et al., 1997).

Para tanto, o conhecimento da fisiologia da reprodução de uma espécie é fundamental para o emprego de biotécnicas, como a sincronização de cio, inseminação artificial e transferência de embriões, que permitem aumentar o potencial reprodutivo, bem como, acelerar o ganho genético (GIOSO et al., 2005).

Existem várias linhas de tratamentos hormonais que permitem a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), sendo que uma destas utiliza implantes ou dispositivos contendo progestágenos associados a tratamentos com estradiol para sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, com o intuito de aumentar a velocidade em que os animais são inseminados no pós-parto, facilitando o manejo e reduzindo o período voluntário de espera (PVE) (BÓ et al., 1995).

O uso de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e seus análogos (agonistas e antagonistas) tornou-se uma valiosa ferramenta para explorar os processos fundamentais da função reprodutiva dos animais (THATCHER et al., 1993).

Agonistas sintéticos do GnRH, aplicados rotineiramente na prática veterinária, têm uma meia-vida maior na circulação sanguínea quando comparado ao decapeptídeo natural e maior afinidade de ligação ao receptor de GnRH (DAVIS et al., 2003).

A administração crônica de agonistas do GnRH em fêmeas bovinas, por exemplo, produz falhas no funcionamento da hipófise e ovário. Os efeitos hipofisários são conhecidos como a infra-regulação da hipófise, que se resume a várias mudanças, dentre elas, baixa regulação dos receptores de GnRH, a dessensibilização da hipófise ao GnRH endógeno, bem como a supressão da liberação pulsátil de LH (GONG et al., 1996; BELLMAN et al. 2002; D'OCCHIO et al, 2002; SCHNEIDER et al, 2002). Tratamentos com fármacos a base de GnRH podem ainda, produzir falhas na capacidade esteroidogênica das células foliculares e ausência de folículos pré-ovulatórios (GONG et al, 1996; RAJAMAHENDRAN et al, 1998;. GARVERICK et al, 2002;. HAMPTON et al., 2004). No entanto, os efeitos do tratamento com GnRH nos oócitos ainda são desconhecidos, porém, informações sobre o número e a qualidade dos ovócitos são fundamentais na busca de novas aplicações pró-fertilidade do GnRH (D'OCCHIO et al., 2000).

O agonista do GnRH acetato de deslorelina, quando utilizado em tratamentos contínuos com implantes contendo 5 mg durante o período de involução uterina, tem uma multiplicidade de efeitos, como por exemplo, o desenvolvimento folicular, maior involução física do útero e colo do útero, aumento da tonicidade da parede uterina, e frequência reduzida de descargas anormais do colo do útero (SILVESTRE et al., 2009) que se dá pela ligação do FSH e LH aos seus receptores, associada com uma ativação direta da adenilato-ciclase para produzir AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e ativar vias de sinalização que aumentam a expressão da COX-2 (Ciclooxigenase dois) e produção de PGE2 (prostaglandina E2) no miométrio e colo uterino (SHEMESH, 2001).

Ambos, AMPc e PGE2 induzem o relaxamento desses tecidos. No entanto, uma condição anovulatória prolongada é imposta após a retirada do tratamento formando barreiras para a fertilidade normal (SILVESTRE et al., 2009). Portanto, uma dose menor do acetato de deslorelina pode ter efeito positivo sobre a involução uterina, sem uma condição anovulatória prolongada.

Outro benefício do agonista do GnRH, acetato de deslorelina, é a indução da ovulação em vacas leiteiras. Ambrose et al. (1998) verificaram que quando utilizado como a última injeção de GnRH do protocolo *Ovsynch* ou no 5º dia do ciclo estral,

induziu maior secreção de LH quando comparado à buserelina (RAJAMAHENDRAN et al., 1998), o que pode melhorar a diferenciação do CL, resultando em maior fase lútea (AMBROSE et al., 1998).

Ambrose et al., (1998) observaram que as vacas que receberam o implante apresentaram melhor taxa de crescimento do CL, e maiores concentrações plasmáticas de P4 comparadas ao grupo controle, concluindo-se que uma liberação prolongada de GnRH fornecida pelo implante de deslorelina induziu um pico de LH de duração maior e, portanto, estimulou de forma mais efetiva a diferenciação e o crescimento do CL, aumentando assim sua funcionalidade.

A liberação crônica do GnRH pela deslorelina, sobre os receptores gonadotrópicos na adenohipófise, cria um período de insensibilidade ao GnRH (D'OCCHIO et al., 2000). Esse estado transitório de insensibilidade para com o GnRH diminui as gonadotropinas de apoio ao crescimento e maturação do folículo. Coletivamente, o uso de uma dose baixa de deslorelina, resulta em função luteal normal ou melhorada (AMBROSE et al., 1998), associada a uma supressão transitória no desenvolvimento do folículo, o que pode aumentar a fertilidade (AMBROSE et al., 1998; RAJAMAHENDRAN et al., 1998; D'OCCHIO et al., 2000; BARTOLOME et al., 2004). Foi observado que folículos pré-ovulatórios maiores geram corpos lúteos (CLs) maiores, que secretam maiores quantidades de P4, melhorando assim o desenvolvimento embrionário inicial e consequentemente aumentando a taxa de prenhez em fêmeas bovinas (VASCONCELOS et al., 2001).

**OBJETIVO GERAL**

Testar o efeito do acetato de deslorelina sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos de vacas leiteiras de alta produção submetidas a protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Restabelecer a ciclicidade em vacas lactantes a partir do 45º dia pós-parto
- 2) Avaliar a adição do acetato de deslorelina dentro de protocolos de IATF, visando aumentar a qualidade do folículo dominante formado.
- 3) Avaliar a capacidade do acetato de deslorelina em promover maior liberação do hormônio folículo estimulante (FSH).
- 4) Comparar as taxas de prenhez em cada grupo

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA: Aplicações do agonista do GnRH acetato de deslorelina na reprodução de bovinos**

**RESUMO:** O hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) é um decapeptídeo neuronal que desempenha papel crucial na reprodução de mamíferos. O GnRH e seus análogos são usados extensivamente no tratamento de doenças hormônio-dependentes, como o anestro pós-parto, por exemplo, sendo aplicado também, em biotécnicas de reprodução assistida. Na Medicina Veterinária, o GnRH e seus agonistas são amplamente integrados a tratamentos pró-fertilidade como superar a redução da fertilidade por disfunção ovariana, induzir a ovulação, melhorar taxas de prenhez, bem como a atividade lútea. Agonistas do GnRH são integrados a tratamentos contínuos, que levam a dessensibilização do eixo hipófise-ovariano, promovendo a baixa regulação dos receptores de GnRH nas células gonadotrópicas, a dessensibilização da adenohipófise ao GnRH endógeno, bem como a supressão da liberação pulsátil de LH, sendo também recomendado para aplicação em tratamentos anti-fertilidade, como a inibição da ovulação ou bloqueio reversível do ciclo estral e para acelerar a involução uterina. O objetivo desta revisão é descrever as características do acetato de deslorelina como agonista do GnRH, seus efeitos benéficos e colaterais dentro de sistemas de produção leiteira.

**Palavras-chave:** Fertilidade, falhas reprodutivas, agonistas GnRH, indutores da ovulação, prenhez

**ABSTRACT:** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a neuronal decapeptide plays a crucial role in mammalian reproduction. GnRH and its analogues are used extensively in the treatment of hormone-dependent diseases, such as postpartum anestrus for example, being applied also in assisted reproductive biotechnologies. Veterinary Medicine, GnRH and its agonists are widely integrated with pro-fertility treatments how to overcome reduced fertility by ovarian dysfunction, induce ovulation, improve pregnancy rates and luteal activity. GnRH agonists are integrated into ongoing treatment, leading to desensitization of the pituitary-ovarian axis, promoting the down regulation of GnRH receptors on gonadotropic cells, anterior pituitary desensitization to endogenous GnRH, as well as the suppression of pulsatile LH release, and also recommended for use in anti-fertility treatments, such as inhibition of ovulation or reversible blockade of the estrous cycle and to accelerate uterine involution. The aim of this review is to describe the characteristics of deslorelin acetate as GnRH agonist, its beneficial effects and side effects in dairy production systems.

**Keywords:** Fertility, reproductive failure, GnRH agonists, induce ovulation, pregnancy



## 1. INTRODUÇÃO

O GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotropinas) ocupa um papel central na função reprodutiva de mamíferos, principalmente pela regulação da síntese e liberação de gonadotropinas pituitárias que por sua vez, modulam a esteroidogênese e a gametogênese (SCHNEIDER et al., 2006).

O GnRH é um neuropeptídeo liberado de forma pulsátil e sincronizada de neurônios que terminam na eminência do hipotálamo basal, uma área irrigada pelos vasos portais hipotalâmico-hipofisários sendo transportado às células gonadotrópicas da adenohipófise, ligando-se aos receptores específicos da superfície celular, desencadeando uma sequência de eventos que incluem a agregação e a internalização de seus receptores, ativação do segundo mensageiro que sinaliza as vias de transdução, a síntese e liberação de LH e FSH (SCHNEIDER et al., 2006).

A internalização dos receptores de GnRH (após sua ligação) induz a um estado transitório de insensibilidade das células gonadotrópicas ao GnRH. Em circunstâncias normais, novos receptores de GnRH são sintetizados e voltam à superfície das células gonadotrópicas, restabelecendo a resposta a subsequentes estímulos (D'OCCHIO et al., 2000; McARDLE et al., 2002).

Duas características distintas de agonistas do GnRH, em relação à sequência do hormônio natural, são de que os agonistas possuem maior afinidade para receptores de GnRH e meia-vida longa na circulação (KARTEN & RIVIER, 1986). Essas propriedades dos agonistas do GnRH permitem que sejam utilizados em doses substancialmente inferiores. A resposta ao tratamento crônico com agonistas do GnRH tem dois componentes: a fase aguda do tratamento, que pode durar por vários dias, e é caracterizada por um aumento súbito das concentrações plasmáticas de LH e FSH, seguida pelo retorno às concentrações basais e a uma fase crônica durante o qual a secreção pulsátil de LH é bloqueada (D'OCCHIO et al., 1996; GONG et al., 1996), ocorrendo mais tarde como consequência, a baixa regulação dos receptores de GnRH em células gonadotrópicas (HAZUM & CONN, 1988) e um desacoplamento das vias para o segundo mensageiro no interior das células. Esta falta de secreção pulsátil de LH e FSH é mantida por um longo tempo provavelmente pelo agonista do GnRH estar em um limiar de concentração circulante (D'OCCHIO & ASPDEN, 1996). As duas fases da

resposta aos agonistas GnRH, levou a estudos sobre o potencial pró-fertilidade e aplicações anti-fertilidade destes fármacos em bovinos.

O acetato de deslorelina é um dos agonistas mais utilizados na clínica reprodutiva veterinária (PETERS, 2005). É um análogo do GnRH produzido pela substituição da glicina na posição 6 pelo triptofano, retirando a glicina da posição 10 e adicionando uma amida na prolina da posição 9 (6-D-triptofano-9-(N-etil-L-prolinamida)-10- Desglicinamida LH-RH) como mostra a Figura 1. Estas substituições dão maior resistência à proteólise e alta afinidade da deslorelina para os receptores. A natureza hidrofóbica volumosa do triptofano na posição 6 estabiliza a configuração ativa da molécula (Figura 2) de deslorelina e sua proteína de ligação aumenta na circulação, prolongando a meia-vida. O receptor de ligação e ativação (agonista) são propriedades do NH<sub>2</sub> terminal, envolvido na ligação. O domínio NH<sub>2</sub> terminal, é predominantemente responsável pela ativação do receptor, possivelmente pela conformação de peptídeos alterados induzidos (SEALFON et al., 1997).

A potência relativa do acetato de deslorelina é 144 vezes maior do que o GnRH e 7,2 vezes maior do que o agonista de GnRH, Buserelina (AMBROSE et al., 1998; PADULA, 2005). Estudos demonstraram que uma solução aquosa de decapeptídeos agonistas do GnRH resulta na liberação de LH e FSH no prazo de 30 minutos após a injeção. Assim sendo, vários agonistas e antagonistas de diversas potências foram desenvolvidos (KIESEL et al., 2002; TRIGG, 2004; RAMAKRISHNAPPA et al., 2005). Interações entre dose, potência e duração do tratamento, determinam em larga escala, se os efeitos pró ou anti-fertilidade são induzidos (PADULA, 2005).

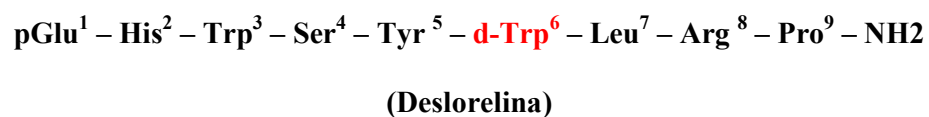
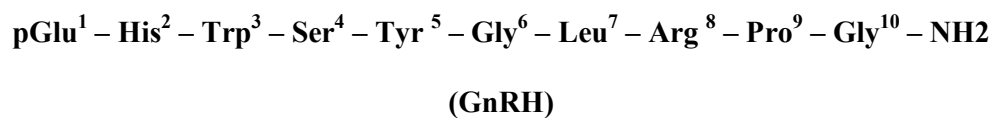


Figura 1 – Estrutura química do acetato de deslorelina (adaptado de PADULLA, 2000; MILLAR et al., 2004).

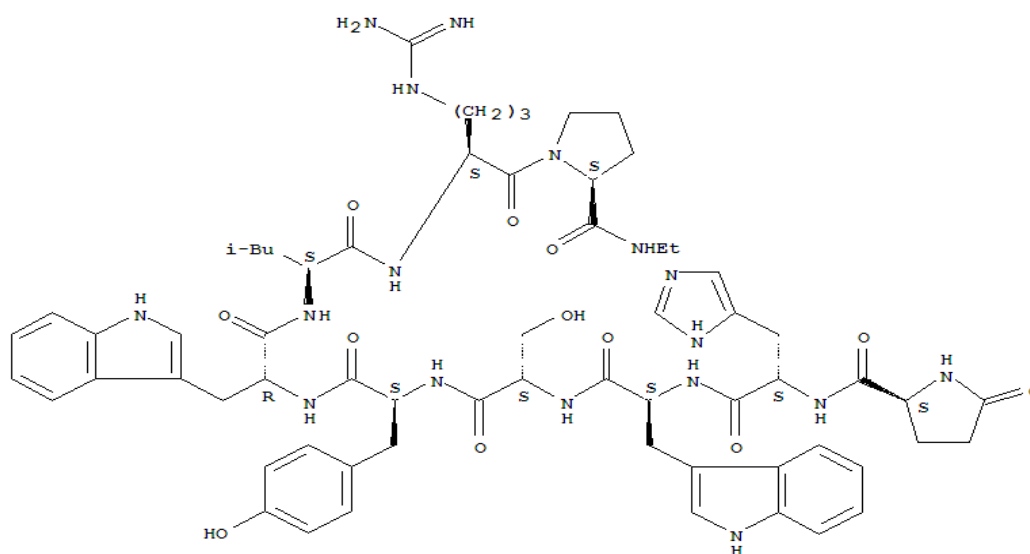


Figura 2 – Estrutura molecular do acetato de deslorelina (<http://www.lookchem.com/Deslorelin/>)

O desenvolvimento de protocolos para impedir a ovulação no pós-parto em bovinos leiteiros oferece tratamento pró-fertilidade, o qual diminui a incidência de patologias uterinas e falhas na atividade ovariana. Fêmeas bovinas tratadas continuamente com agonistas GnRH, possuem dessensibilização dos receptores gonadotrópicos hipofisários ao estímulo do GnRH, o que restringe a liberação de gonadotropina pulsátil e inibição do desenvolvimento folicular na fase 2 a 3 mm (GONG et al., 1996). A supressão reversível do ciclo estral em novilhas tem sido alcançada com êxito usando o tratamento contínuo com potentes agonistas GnRH (D'OCCHIO et al, 1996; GONG et al, 1995).

Estudos iniciais utilizando tratamentos a base de agonistas GnRH durante o puerpério, visaram a redução do anestro pós-parto em diferentes esquemas (forma intermitente ou contínua) pela avaliação da capacidade de induzir o breve retorno da ciclicidade (ADAMS, 2005).

Frente às características acima expostas, esta revisão tem como objetivo abordar a aplicação do acetato de deslorelina e seus benefícios na reprodução de vacas leiteiras de alta produção.

## **2. EFEITOS DA DESLORELINA NA ADENOHIPÓFISE**

### **2.1 SECREÇÃO DE LH E FSH**

A secreção de gonadotropinas durante o tratamento contínuo com agonistas do GnRH é caracterizada por duas fases: a fase aguda, que pode durar vários dias, onde a secreção de LH é aumentada em touros (MELSON et al., 1986) e novilhas (D'OCCHIO et al., 1996) seguido por uma fase crônica, onde a liberação pulsátil de LH é bloqueada, porém, a secreção basal é mantida (MELSON et al., 1986). Em um estudo, vacas holandesas de alta produção tratadas com implante subcutâneo contendo 2100 µg de deslorelina, apresentaram supressão do LH, indicando dessensibilização dos receptores gonadotrópicos. A ausência da ovulação após injeção com GnRH, confirma que a secreção de grande quantidades de LH não ocorreu (MATTOS et al., 2001), concordando com relatos prévios, nos quais bovinos submetidos a desafios com agonistas GnRH tiveram respostas ao LH atenuadas ou completamente abolidas após tratamento crônico (GONG et al., 1996). Observou-se também, que injeções repetidas

de deslorelina, uma ou duas vezes por semana, por um período de dois meses, alterou significativamente os ciclos ovarianos de algumas vacas; houve respostas individuais variadas que foram do anestro completo, a ciclos irregulares (PADULA & MACMILLAN, 2005). Vacas leiteiras demonstraram sensibilidade ao tratamento com deslorelina aplicada durante três dias consecutivos no pós-parto imediato, o que resultou em um prolongado período de anestro pós-parto (PADULA et al., 2000).

O tratamento contínuo de vacas com agonistas do GnRH pode induzir a baixa regulação dos receptores GnRH em células gonadotrópicas, dessensibilizando a adenohipófise para suprimir a liberação pulsátil de LH (D'OCCHIO et al., 2000), que conseqüentemente, impede o desenvolvimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (CL).

### **3. APLICAÇÕES PRÓ-FERTILIDADE DA DESLORELINA**

#### **3.1 INDUÇÃO E REESTABELECIMENTO DA OVULAÇÃO**

O desenvolvimento folicular ovariano é um processo dinâmico caracterizado pela emergência de ondas sucessivas, sendo que cada onda de crescimento folicular consiste em um grupo de folículos recrutados de um “*pool*” de folículos antrais, os quais são gonadotropina dependentes (FIGUEIREDO et al., 2000).

A fertilidade do período pós-parto é influenciada negativamente pela incidência de anestro. Esta última condição é caracterizada pela ausência de comportamento de estro, que pode ser uma indicação de condições de qualidade inferior (por exemplo, a alimentação inadequada periparto) ou de condições patológicas (por exemplo, doenças crônicas debilitantes ou doenças do útero e ovários). Embora o início do crescimento folicular ovariano durante o período pós-parto, geralmente não seja afetado, o desenvolvimento subsequente (desvio) e o destino do folículo dominante são os principais fatores que afetam o restabelecimento da ciclicidade ovariana (PETER et al., 2009).

Os agonistas GnRH são utilizados para induzir a ovulação em protocolos de sincronização do ciclo estral (SCHMITT et al, 1996; PURSLEY et al, 1998).

Segundo Melo et al. (2005), a deslorelina e o extrato de pituitária equina (EPE), apresentam-se como alternativas eficazes para o desencadeamento da ovulação em tempo pré-determinado sem a ocorrência da formação de anticorpos, desta forma, podendo ser utilizadas em vários ciclos consecutivos.

O aumento da secreção pulsátil de LH pela adenohipófise é responsável pela ovulação, desenvolvimento e diferenciação do corpo lúteo (CL) (PETERS et al., 1994). A administração de deslorelina induz um pico de LH normal e eleva o LH basal. Altas concentrações basais de LH durante os primeiros estágios do ciclo estral podem estimular o desenvolvimento e a diferenciação do CL em vacas com a ovulação induzida por implantes de deslorelina (THATCHER et al., 1993).

Bartolome et al. (2004) sincronizaram e induziram a ovulação em vacas secas e novilhas com implantes contendo 750 µg ou 1000 µg de acetato de deslorelina e diacetato de gonadorelina 100 µg. O implante contendo deslorelina não suprimiu as concentrações plasmáticas de P4, mas sim, aumentou as concentrações da mesma no final do diestro. No entanto, estes aumentos foram esporádicos e de magnitude mínima. As diferenças podem ser explicadas devido à sensibilidade de cada vaca frente às diferentes doses do implante (BARTOLOME et al., 2004) que em estudos futuros, devem ser reajustadas para minimizar o retorno anormal do estro e da ovulação.

A retomada da ciclicidade é claramente um ponto crítico dentro de um sistema produtivo, e deve ser reestabelecida o mais breve possível no pós-parto para o aumento nas taxas de prenhez, levando-se em consideração as interações ambientais, nutricionais e endócrinas (PETERS & LAMMING, 1990).

### 3.2 INVOLUÇÃO UTERINA

O período do puerpério é um processo fisiológico e global de modificações que ocorrem na genitália da fêmea depois do parto, levando o órgão à recuperação das transformações ocorridas durante o período da prenhez, para finalmente atingir volume, tamanho e posição, adquirindo novamente a capacidade reprodutiva para futura gestação. A completa involução do útero ocorre em uma faixa que varia de 25 a 30 dias pós-parto (DPP), nos quais o tamanho do útero aproxima-se do estado pré-gravídico (HUSSAIN & DANIEL, 1991; AMBROSE et al., 2007), envolvendo a contração da musculatura uterina para a descamação do tecido caruncular excessivo, a qual tem seu

início no sexto ou sétimo dia pós-parto, sendo acompanhada pela degeneração granular do sarcoplasma, vacuolização e atrofia do núcleo da célula miometrial sem necrose celular (OLSON et al., 1986).

O retorno da ciclicidade em vacas lactantes está intimamente relacionado ao aumento das taxas de involução uterina em vacas lactantes. Se o primeiro cio pós-parto ocorrer na presença de um útero contaminado, o prolongamento da fase lútea poderá ocorrer (SMITH & WALLACE, 1998; OPSOMER et al, 2000; ROYAL et al, 2000 b) dificultando a involução uterina.

Durante as primeiras semanas pós-parto, o sistema imunológico da vaca é posto à prova severamente (GOFF & HORST, 1997). A maioria das vacas desenvolve uma endometrite leve e não patológica durante o puerpério. O início da endometrite está associado com um aumento na concentração de progesterona (LEWIS, 1997).

Animais que desenvolvem endometrite apresentaram menor concentração de prostaglandina (PGFM) durante o período pós-parto (isto é, 0 a 14 dias pós-parto), o que contribui para uma redução da função dos neutrófilos, comprometendo assim, a capacidade do útero de prevenir e/ou tratar infecções, que suprimem a liberação do GnRH pelo hipotálamo com eventual redução na secreção do LH, retardando a função ovariana, ou seja, a foliculogênese (MATEUS et al., 2002).

A administração do acetato de deslorelina, na forma de implantes em vacas lactantes no pós-parto imediato, é capaz de suprimir o crescimento folicular, reduzir as concentrações de estradiol e atrasar tanto o desenvolvimento do CL, como suas concentrações de progesterona (MATTOS et al., 2001).

Um experimento envolvendo tratamentos contínuos com agonistas GnRH (deslorelina, 5mg) durante o período de involução uterina, apresentou uma multiplicidade de efeitos, dentre eles, relatam-se a involução física do útero e colo do útero, aumento da tonicidade da parede uterina, que culminam com a redução de descargas uterinas (SILVESTRE et al., 2009). No entanto, uma condição anovulatória prolongada após a retirada do tratamento impõe uma barreira à fertilidade normal devido à redução da atividade ovariana (SILVESTRE et al., 2003). Foi demonstrado também que a influência contínua de agonistas GnRH por mais de uma semana, pode comprometer a atividade ovariana prejudicando o desenvolvimento de folículos e oócitos bovinos (SCHNEIDER et al., 2006). Portanto, uma dose menor de deslorelina pode ter efeito positivo sobre a involução uterina sem uma condição anovulatória prolongada como mostrou MATTOS et al., (2001), onde vacas receberam um implante

degradável contendo 2,1 mg de deslorelina no 7º dia pós-parto obtendo resposta a um protocolo de sincronização de cio com ovulação no 69º dia pós-parto (DPP).

Mais investigações são necessárias sobre o efeito da deslorelina com doses ajustadas em tratamentos que visam otimizar a involução uterina e a ativação sincronizada da atividade ovariana em vacas leiteiras de alta produção.

#### **4. APLICAÇÕES ANTI-FERTILIDADE DO ACETATO DE DESLORELINA**

Recentemente, implantes contendo o agonista GnRH deslorelina, tornaram-se disponíveis para fins de investigação sobre a inibição da prenhez em vacas e novilhas (D'OCCHIO et al., 2002).

Agonistas do GnRH foram originalmente desenvolvidos para tratar a infertilidade tanto em machos quanto em fêmeas, contudo, efeitos inibitórios foram observados quando administrados em doses elevadas (NILLIUS et al., 1980). Eles diferem do GnRH biológico por apresentarem maior meia-vida e grande afinidade de ligação aos receptores gonadotrópicos (CONN & CROWLEY, 1991), capaz de suprimir o ciclo estral (D'OCCHIO et al., 2002), mas podendo reverter este estado (GONG et al., 1995).

O tratamento crônico com agonistas do GnRH apresenta duas ações: a primeira fase, conhecida como estimulação, é caracterizada pelo aumento imediato nas concentrações de gonadotropinas plasmáticas, estimulando o crescimento do folículo e podendo causar a indução da ovulação (BERGFELD, D'OCCHIO & KINDER, 1996; GONG et al., 1995; RAJAMAHENDRAN et al., 1998). A segunda fase, ou supressão, bloqueia as secreções de LH. Este bloqueio é mantido pelo tempo em que o fármaco encontra-se presente na circulação, o que leva à inibição da ovulação em concentrações suficientes (D'OCCHIO et al., 1996).

Implantes absorvíveis de deslorelina contendo doses médias e baixas foram colocados em novilhas zebuínas, de 14 a 23 meses de idade, destinadas a coberturas futuras, para verificar a capacidade do hormônio em promover a supressão temporária da fertilidade. O tratamento com baixas e médias doses de deslorelina reduziu significativamente a proporção de novilhas que conceberam. Estes resultados indicaram que bioimplantes contendo deslorelina têm potencial de aplicação no controle do tempo



da primeira concepção em novilhas mantidas em manejos extensivos (D'OCCHIO et al., 2000).

## **5. CONCLUSÕES**

Estudos recentes confirmaram os potenciais efeitos pró e anti-fertilidade pelo uso de agonistas do GnRH em bovinos, aplicados no desenvolvimento de modelos experimentais para a abordagem de questões relacionadas ao desenvolvimento folicular e maturação de oócitos. Esta revisão destaca o potencial da utilização de deslorelina, no estudo dos seus efeitos sobre a ovulação precoce, refletido na fertilidade subsequente de vacas leiteiras pós-parto. Mais estudos são necessários para entender os fatores responsáveis pela variabilidade na retomada da atividade ovulatória após a interrupção do tratamento. Há muito a ser esclarecido a respeito da influência de diferentes doses do agonista GnRH deslorelina sobre o sistema reprodutivo, por pesquisas promissoras no que tange ao desenvolvimento de fármacos inovadores e novas medidas terapêuticas para o uso do acetato de deslorelina em vacas leiteiras.

**REFERÊNCIAS**

- Adams, T. E. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 88, pág. 127–139, 2005.
- Ambrose, J. D.; Pires, M. F. A.; Moreira, F.; Diaz, T.; Binelli, M.; Thatcher, W. W. Influence of deslorelin (GnRH agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 50, pág. 1157–1170, 1998.
- Bartolome, J. A.; Santos, J. E. P.; Pancarci S. M.; Melendez, P.; Arteché A. C. M.; Hernandez O. Induction of ovulation in nonlactating dairy cows and heifers using different doses of a deslorelin implant. **Theriogenology**, v. 61, pág. 407–419, 2004.
- Bellmann, A.; Schneider, F.; Kanitz, W.; Nürnberg, G.; Tiemann, U.; Effect of GnRH and its antagonist (Antarelix) on LH release from cultured bovine anterior pituitary cells. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, pág. 79–92, 2002.
- Bergfeld, E. G. M.; D’Occhio, M. J.; Kinder, J. E. Pituitary function, ovarian follicular growth, and plasma concentrations of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone in prepubertal heifers during and after treatment with the luteinizing hormone-releasing-hormone agonist deslorelin. **Biology of Reproduction**, v. 54, pág. 776–782, 1996.
- Bó, G. A.; Adamns, G. P.; Pierson, R. A.; Mapletoft, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, pág. 31-40, 1995.
- Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *Journal of New England Medicine*, v. 324, pág. 93–103, 1991.
- Davis, T. L.; Mussard, M. L.; Jimenez-Severiano, H.; Enright, W. J.; Kinder, J.E. Chronic treatment with an agonist of gonadotropin-releasing hormone enhances luteal function in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, pág. 398–403, 2003.
- D’Occhio, M. J. Aspden, W. J.; Whyte, T. R. Controlled, reversible suppression of oestrous cycles in beef heifers and cows using agonists of luteinizing hormone-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 74, pág. 218–225, 1996.
- D’Occhio, M. J.; Fordyce, G.; Whyte, T. R.; Aspden, W. J.; Trigg, T. E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science** v. 60, pág. 433–442, 2000.
- D’Occhio, M. J.; Fordyce, G.; Whyte, T. R.; Jubb, T. F.; Fitzpatrick, L. A.; Cooper, N. J.; Aspden, W. J.; Bolam, M. J., Trigg, T. E. Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. **Animal Reproduction Science**, v. 74, pág. 151–162, 2002.
- FAO. Food and Agriculture Organization of United Nation. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 10 de outubro de 2009.

Figueiredo, M. M. N.; Fonseca, F. A.; Torres, C. A. A.; Galimberti, A. M.; Almeida, C. D. A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras no pós-parto após tratamentos com busereлина (GnRH) e cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, pág. 725-731, 2000

Garverick, H. A.; Baxter, G.; Gong, J.; Armstrong, D. G.; Campbell, B. K.; Gutierrez, C. G.; Webb, R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. **Reproduction**, v. 123, pág. 651-661, 2002.

Gioso, M. M.; Costa, E. P.; Fernandes, C. A. C.; Torres, C. A. A.; Carvalho, G. R. C. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, pág.1181-1187, 2005.

Goff, J. P.; Horst, R. L.; Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic diseases. **Journal of Dairy Science**, v. 80, pág. 1260-1268. 1997.

Gong, J. G.; Bramley, T. A.; Gutierrez, C. G.; Peters, A. R.; Webb, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, pág. 263-270, 1995.

Gong, J. G.; Campbell, B. K.; Bramley, T. A.; Gutierrez, C. G.; Peters, A. R.; Webb, R.; Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, pág. 68-74, 1996.

Hampton, J. H.; Bader, J. F.; Lamberson, W. R.; Smith, M. F.; Youngquist, R. S.; Garverick, H. A. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. **Reproduction**, v. 127, pág. 695-703, 2004.

Hazum, E., Conn, P.M. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone GnRH. Action: I. The GnRH receptor. **Endocrinology**, v. 9, pág. 379-386, 1988

Hussain, A. M.; Daniel, R. C. W. Bovine endometritis: Current and future alternative therapy. **Journal of Veterinary Medicine**. V. 38, pág. 641-651, 1991.

Karten, M. J.; Rivier, J. E. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies towards the development of agonists and antagonists: rationale and perspectives. **Endocrinology**, v. 7, pág. 44-66, 1986.

Kiesel, L. A.; Rody, A.; Greb, R. R.; Szilagyi, A. Clinical uses of GnRH analogues. **Clinical Endocrinology**, v. 56, pág. 677-687, 2002.

MacMillan, K. L.; Day, A. M.; Taufá, V. K.; Gibb, M.; Pearce, M. G. Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone in cattle. I. Hormone concentrations and oestrous cycle length. **Animal Reproduction Science**, v. 8, pág. 203-212, 2002

- Kiesel, L. A.; Rody, A.; Greb, R. R.; Szilagy, A. Clinical uses of GnRH analogues. **Clinical Endocrinology**, v. 56, pág. 677–687, 2002.
- Lewis, G. S.; Symposium: health problems of the post-partum cow. Uterine health and disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, pág. 984–994, 1997.
- Lopez, H.; Satter, L. D.; Wiltbank, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, pág. 209-233, 2004.
- Mateus, L.; Da Costa, L. L, Bernardo, F.; Silva, J. R. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 37, pág. 31–35, 2002.
- Mattos, R.; Orlandi, I. C.; Williams, I. J.; Staples, I. C. R.; Trigg, I. T.; Thatcher, W. W. Effect of an implant containing the GnRH agonist deslorelina on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 56, pág. 371-386, 2001.
- McArdle, C. A.; Franklin, J.; Green, L.; Hislop, J. N.;. Signaling, cycling and desensitization of gonadotrophin releasing hormone receptors. **Journal of Endocrinology**, v. 173, pag. 1–11, 2002.
- Melo, C. M.; Papa, F. O.; Medeiros, A. S. L.; Dell'aqua Jr, J. A.; Carmo, M. T.; Araújo, G. M.; Alvarenga, M. A. Efeito da deslorelina e do extrato de pituitária equina na indução da ovulação em éguas. In: XIX Reunião Anual da SBTE, 2005, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p.193, 2005.
- Melson, B. E.; Brown, J. L.; Schoenemann, H. M.; Tarnavsky, G. K.; Reeves, J. J. Elevation of serum testosterone during chronic LHRH agonist treatment in the bull. **Journal of Animal Science**, v. 62, pág. 199–207, 1986.
- Millar R.; Lu Z-L; Pawson, A. J.; Flanagan, C. A.; Morgan, K.; Maudsley, S. R. Gonadotropin-releasing hormone receptors. **Endocrinology**, v.25, pág. 235–75, 2004.
- Nillius, S. J.; Berquest, C.; Wide, L. Chronic treatment with the gonadotropin-releasing hormone agonist D-ser(TBU)6-EALRH for contraception in women and men. **Int J Fertil**, v. 25, pág. 239–246, 1980.
- Olson, J. D.; Bretzlaff, K. N.; Mortimer, R. G.; Ball, L. The metritis-pyometra complex. In: Morrow, D.A. (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology*, Saunders W.B., Philadelphia, PA, pp. 227–236, 1986.
- Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., de Kruf, A. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v. 53, pág. 841–857, 2000.
- Padula, A. M.; McGowan, M. R.; Verrall, R.; Trigg, T. E.; Macmillan, K. L. Absorbable deslorelin implants delay the resumption of ovulatory cycles in postpartum

dairy cattle (Abstract). In: **Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction**, Stockholm, Sweden, 2000.

Padula, A. M.; Macmillan, K. L. Observations on the reproductive effects of once or weekly injections for 6 weeks of the GnRH agonist deslorelin in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 85, pág. 223–230, 2005.

Peter, A. T.; Vos, P. L. A. M.; Ambrose, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 66, pág...., 2009.

Peters, A.R., Lamming, G.E. Lactational anoestrus in farm animals. *Oxford Rev. Biology Reproduction*, v. 12, pág. 245–288, 1990.

Peters, A. R.; Benboulaid, M. Studies on the timing of ovulation after synchronization treatments in cattle. **Reprod. Dom. Anim**, v. 33, pág. 313–315, 1998.

Peters, K. E.; Bergfeld, E. G.; Cupp, A. S.; Kojima, F. N.; Mariascal, V.; Sanchez, T. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology Reproduction**, v. 51, pág. 1248–1254, 1994.

Peters, A. R. Veterinary clinical application of GnRH - questions of efficacy. **Animal Reproduction Science**, v. 88, pag.155–67, 2005

Pritchard, J. Y.; Schrick, F. N.; Inskeep, E. K. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. **Theriogenology**, v. 42, pág. 247–59, 1994.

Pursley, J. R.; Kosorok, M. R.; Wiltbank, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**. v. 80, pág. 301–306, 1997.

Pursley, J. R.; Silcox, R. W.; Wiltbank, C. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy losses, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, pág. 2139–2144, 1998

Ramakrishnappa, N.; Rajamahendran R.; Yung-Ming L.; Leung P. C. K. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. **Animal Reproduction Science**, v. 88, pág. 95–113, 2005.

Rajamahendran, R.; Ambrose, J. D.; Schmitt, E. J.; Thatcher, M. J.; Thatcher, W. W. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 50, pág. 1141–1155, 1998.

Royal, M. D.; Darwash, A. O.; Flint, A. P. F.; Webb, R.; Wooliams, J. A.; Lamming, G. E. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Journal of Animal Science**, v. 70, pág. 487–501, 2000.

Royal, M.; Mann, G. E.; Flint, A. P. F. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. **Veterinary Journal**, v. 160, pág. 53–60, 2000.

Saiduddin, S.; Riesen, J. W.; Tyler, W. J.; Casida, L. E. Relation of postpartum interval to pituitary gonadotropins, ovarian follicular development and fertility in dairy cattle (Effect of suckling, feeding level, breeding management and genetic level of milk production). Studies of the postpartum cow. **Res. Bull.** V. 270, pág. 15–26, University of Wisconsin, 1968.

Santos, J. P. E.; Bartolome, J. A.; Cerri, R. L. A.; Juchem, S. O.; Hernandez, O.; Trigg, T.; Thatcher, W.W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, pág. 421-435, 2004.

Sealfon, S., Weinstein, H., Millar, R. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin releasing hormone receptor. **Endocr. Rev.** 18, 180–205, 1997.

Shemesh M. Shemesh. Action of gonadotrophins on the uterus, **Journal of Reproduction Fertility**, v. 12, pág. 835–842, 2001.

Schneider, F.; Bellmann, A.; Becker, F.; Bambang Poernomo, S.; Rehfeldt, C.; Nürnberg, G.; Kanitz, W. Gonadotropin release in periovulatory heifers after GnRH analogs measured by two types of immunoassays. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 111, pág. 235–244, 2002.

Schneider, F.; Heleil, B.; Alm, H.; Torner, H.; Becker, F.; Viergutz, T.; Nürnberg, G.; Kanitz, W. Endocrine, morphological, and cytological effects of a depot GnRH agonist in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 92, pág. 9–28, 2006.

Schmitt, E.J., Diaz, T., Drost, M., Thatcher, W.W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 74, pág. 1084–1091, 1996.

Smith, M.C., Wallace, J.M. Influence of early postpartum ovulation on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 10, pág. 207–216, 1998.

Schneider, F.; Tomek, W.; Gründker, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. **Theriogenology**, v. 66, pág. 691–709, 2006.

Silvestre, F. T.; Kamimura, S.; Bartolome, J. A.; Arteche, A. C. M.; Pancarci, S. M.; Thatcher, W. W. Reproductive responses following postpartum suppression of follicular development with a Deslorelin implant during summer heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 86, pág 52, Abstract, 2003

Silvestre, F. T.; Silvestre, J. A.; Bartolome, S.; Kamimura, A. C.; Arteche, S. M.; Pancarci, T. Postpartum suppression of ovarian activity with a Deslorelin implant enhanced uterine involution in lactating dairy cows, **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 79–95, 2009.

Thatcher, W. W.; Drost, M.; Savio, J. D.; Macmillan, K. L.; Entwistle, K. W.; Schmitt, E. J.; De la Sota, R. L.; Morris, G. R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, pág. 27–49, 1993.

Thatcher, W. W.; Moreira, F.; Santos, J. E. P.; Mattos, R. C.; Lopez, F. L.; Pancarci, S. M.; Risco, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, pág. 75-90, 2001.

Thatcher, W. W.; Guzeloglu, A.; Meikle, A.; Kamimura, S.; Bilby, T.; Kowalski, A. A.; Badinga, L.; Pershing, R.; Bartolome, J.; Santos, J. E. P. Regulation of embryo survival in cattle. **Reproduction** (Suppl. 61), pág. 253–266, 2002.

Trigg, T. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. **Animal Reproduction Science**, v.88, pág. , 2005

Vasconcelos, J.L.M.; Sartori, R.; Oliveira, H.N.; Guenther, J.G.; Wiltbank, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.

<http://www.lookchemystri.com/Deslorelin/> com acesso em 12/11/2020.

**CAPÍTULO 2**

**EFEITO DO ACETATO DE DESLORELINA SOBRE O**

**DESENVOLVIMENTO DE FOLICULOS OVARIANOS EM VACAS**

**HOLANDESAS DE ALTA PRODUÇÃO SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE**

**IATF**



## EFEITO DO ACETATO DE DESLORELINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FOLICULOS OVARIANOS EM VACAS HOLANDESAS DE ALTA PRODUÇÃO SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE IATF

(deslorelin acetate effects on development of ovarian follicles in high production Holstein cows under TAI protocols)

**RESUMO:** A expansão do nosso conhecimento sobre o controle da dinâmica folicular do ciclo estral de vacas leiteiras de alta produção resultou em novas perspectivas da precisão sobre o controle da ovulação, a qual pode ser mecanicamente controlada por tratamentos a base de agonistas GnRH em combinação com progestágenos, estradiol e prostaglandinas para a emergência sincronizada de uma nova onda folicular, bem como, o aumento nas taxas de prenhez. Este estudo teve o objetivo de identificar a ação do agonista do GnRH acetato de deslorelina sobre o reestabelecimento da atividade ovarina em vacas holandesas de alta produção (média de produção acima de 25 L) com média de 45 dias pós-parto. Foram realizados dois experimentos. No experimento A, todos os animais (n = 20) receberam no dia 0 do protocolo, um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona natural (Cronipres monodose<sup>®</sup>/Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR) e 2 mg de benzoato de estradiol (BE) (Cronibest<sup>®</sup>/Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR) IM. Após a remoção do implante no dia 8, aplicou-se pela via IM em todos os animais, 0,150 mg de d-cloprostenol (Croniben<sup>®</sup>/Biogénesis-Bagó, Curitiba, PR) e após este procedimento, as vacas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: Grupo 1 (G1) (n=10), sem tratamento ao D 8, e o Grupo 2 (G2) (n=10), no qual se administrou 100 µg de acetato de deslorelina – dose indutora (veículo de liberação rápida) (UNESP – Botucatu, SP) via IM no D 8. No dia 10, apenas o grupo G 1 recebeu a 2ª dose do acetato de deslorelina por via IM, já que os animais do grupo G 2 ovularam 24 horas após a primeira aplicação da deslorelina, decidindo-se então, não inseminá-las. Apenas o grupo G1 foi submetido à inseminação artificial em tempo fixo no dia 11 do protocolo com uma taxa de prenhez de 40% (4-10). No experimento A, ficou evidente que o acetato de deslorelina foi capaz de promover aumento significativo nas concentrações plasmáticas de FSH (G2=3,4047 ± 0,7943; G1=1,5324 ± 1,1405) e (P=0,0001), porém, ao mesmo tempo, as concentrações plasmáticas de LH aumentaram significativamente (G2=14,2870 ± 6,3588; G1=1,4510 ± 0,3753) e (P=0,001), fazendo com que as vacas do G 2 ovulassem precocemente. Não se descarta a possibilidade do primeiro protocolo ser utilizado em rebanhos leiteiros e para isso, mais estudos são necessários.

No experimento B, vacas (n=52), receberam o mesmo protocolo utilizado para o experimento A citado acima, porém a dose aplicada de acetato de deslorelina no D 8 foi de 150 µg, em veículo de liberação lenta. Avaliações ultrassonográficas foram realizadas dos dias 0 ao 11 do protocolo e amostras de sangue foram coletadas todos os dias em cinco animais de cada grupo para ambos os experimentos. No experimento B, o diâmetro (cm) do folículo pré-ovulatório apresentou diferenças significativas (G1=1,5785 ± 0,0896; G2=1,7222 ± 0,1095) e (P=0,0001). A taxa de prenhez no experimento 1B foi maior no G2 (57,7 %) em relação ao G1 (34,61 %). As concentrações plasmáticas de LH diferiram significativamente entre os tratamentos (G1=1,5103 ± 0,5750; G2=15,9065 ± 4,3902) e (P= 0,02830). Como conclusão, a dose de 150µg de acetato de deslorelina administrada nos animais do G2 do experimento B foi capaz de estimular o desenvolvimento folicular, formando folículos pré-ovulatórios maiores e por consequência, melhorando a função lútea, porém uma vez que as

concentrações plasmáticas de progesterona foram maiores nos dias 3 e 7 pós-inseminação artificial para o grupo G2 em relação ao G1 (D3 G1=0,8217 ± 0,5000; G2=2,4654 ± 2,7300) e (D7 G1=3,1860 ± 0,8400; G2=4,1833 ± 4,1700) com P=0,0283.

**Palavras-chave:** indução de ovulação, reprodução, inseminação artificial, recrutamento folicular.

**Abstract:** Expanding our knowledge about the control of follicular dynamics of the estrous cycle of dairy cows with high production resulted in new perspectives on the control precision of ovulation, which can be mechanically controlled by treatments based on GnRH agonists in combination with progesterone, estradiol and prostaglandins to the emergence of a new synchronized follicular wave, as well as the increase in pregnancy rates. This study aimed to identify the action of GnRH agonist deslorelin acetate on the reestablishment of ovarian activity in high production Holstein cows (average yield above 25 L) with an average of 45 days postpartum. Two experiments were conducted. In the experiment, all animals (n = 20) received on day 0 of the protocol, an intravaginal device containing 558 mg of natural progesterone (Cronipres monodose ® / Biogenesis-Bago, Curitiba, PR) and 2 mg of estradiol benzoate (BE) (Cronibest ® / Biogenesis-Bago, Curitiba, PR) IM. After removal of the implant on day 8, was applied by IM injection in all animals, 0,150 mg d-cloprostenol (Croniben ® / Biogenesis-Bago, Curitiba, PR) and after this procedure, the cows were randomly divided into two groups: Group 1 (G1) (n = 10), without treatment D 8, and Group 2 (G2) (n = 10), in which it was administered 100 mg of deslorelin acetate - inducing dose (vehicle quick release) (UNESP - Botucatu, SP) intramuscularly in D 8. On day 10, only the G 1 received a 2nd dose of acetate deslorelin intramuscularly, since the animals in group G 2, ovulated 24 hours after the first injection of deslorelin, deciding then not inseminate them. Only the group G 1 underwent artificial insemination at fixed time on 11 of the protocol with a pregnancy rate of 40% (4-10). In experiment A, it was evident that the deslorelin acetate was able to promote significant increase in plasma FSH (G2 =  $3.4047 \pm 0.7943$ , G2 =  $1.5324 \pm 1.1405$ ) and (P = 0.0001), but at the same time, plasma concentrations of LH increased significantly (G2 =  $14.2870 \pm 6.3588$ ,  $1.4510 \pm 0.3753$  = G1) and (P = 0.001), causing the cows of the G 2 ovulate early. Not rule out the possibility of the first protocol to be used in dairy cattle and therefore, more studies are needed.

In experiment B, cows (n = 52), received the same protocol used for the experiment cited above, but the applied dose of deslorelin acetate on D 8 was 150 mg in slow-release vehicle. Ultrasonographic evaluations were performed from days 0-11 of the protocol and blood samples were collected every day at 5 animals from each group for both experiments. In experiment B, the diameter (cm) of preovulatory follicle showed significant differences (G1 =  $1.5785 \pm 0.0896$ , G2 =  $1.7222 \pm 0.1095$ ) and (P = 0.0001). The pregnancy rate in experiment 1B, was higher in G2 (57.7%) compared to G1 (34.61%). Plasma concentrations of LH differed significantly between treatments (G1 =  $1.5103 \pm 0.5750$ , G2 =  $15.9065 \pm 4.3902$ ) and (P = 0.02830). In conclusion, the dose of 150µg of deslorelin acetate administered in the G2 B of the experiment was able to stimulate follicular development, forming pre-ovulatory follicles larger and consequently, improving luteal function but since the plasma concentrations of progesterone were higher on days 3 and 7 post insemination for G2 compared to G1 (G1 D3 =  $0.8217 \pm 0.5000$ , G2 =  $2.4654 \pm 2.73$ ) and (D7 G1 =  $3.18 \pm 0$ , 84, G2 =  $4.18 \pm 4.17$ ) with P = 0.0283.

**Keywords:** ovulation induction, reproduction, artificial insemination, follicle recruitment

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, o uso de novas tecnologias, especialmente aquelas relacionadas à produção animal, tornaram-se de grande importância para a melhoria da produção pecuária no mundo. Dentre essas novas tecnologias, destaca-se a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), a qual tem sido utilizada por mais de duas décadas para que ganhos genéticos desejáveis sejam alcançados. No entanto, a variabilidade na resposta aos tratamentos hormonais, tempo e esforço necessário para realizar estes tratamentos, limitam sua aplicação e generalizam o sucesso desta biotecnologia. Protocolos atuais, designados para controlar tanto a função luteal, bem como a folicular, proporcionam a sincronização de estro sem a necessidade de detecção do cio (BÓ et al., 2002).

Muitos tratamentos hormonais foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a velocidade em que os animais são inseminados no pós-parto, facilitando o manejo e aumentando a eficiência reprodutiva, sendo um deles, o uso de dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato de estradiol (BE) amplamente utilizado em programas de sincronização da ovulação para IATF tanto em vacas de corte quanto em vacas leiteiras (MACMILLAN e PETERSON, 1993; MACMILLAN e BURKE, 1996; BÓ et al., 2002). O tratamento consiste na administração de 2 mg de BE no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (P4) no dia 0, retirada do dispositivo e administração de PGF $2\alpha$  IM no dia 7 ou 8. Porém, mesmo com o uso destes protocolos hormonais, as baixas taxas de prenhez continuam a ser um problema, principalmente em bovinos de leite de alta produção em sistema confinado (*Free stall*). O problema da baixa fertilidade em bovinos leiteiros parece ter múltiplas causas e dentre elas, cita-se a baixa concentração de estradiol (E2) circulante no pró-estro (COLAZO et al., 2003).

O alto metabolismo hepático em vacas de alta produção afeta tanto as concentrações de E2 no pró-estro, como também diminui as concentrações de progesterona (P4) circulantes no diestro (SANGSRITAVONG, et al., 2002).

Em vacas leiteiras, a correlação entre produção de leite e ingestão de matéria seca é positiva. Vacas de maior produção apresentam menor concentração de P4. O aumento da ingestão de matéria seca com alta densidade nutricional pode reduzir a concentração de progesterona, o que poderia influenciar negativamente a reprodução.

Isto ocorre porque com a maior ingestão, o fluxo sanguíneo na veia porta é aumentado, disponibilizando mais progesterona no fígado, que será metabolizada, ou seja, maior “*clearance*” ou remoção deste hormônio pelo fígado. Portanto, os protocolos de sincronização da ovulação devem ser delineados visando aumentar os níveis de P4 antes e depois da Inseminação Artificial (IA), para garantir a prenhez (VASCONCELOS, 1998).

Visando rebater estes problemas, programas que englobam o uso do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e seus análogos (agonistas e antagonistas) tornou-se uma valiosa ferramenta para explorar os processos fundamentais da função reprodutiva dos animais. Qualquer uso racional destes compostos para aplicação em diversos sistemas de manejo reprodutivo no intuito de se aumentar as taxas de concepção deve basear-se, contudo, a uma profunda compreensão dos seus efeitos biológicos sobre o sistema reprodutor-endócrino (THATCHER et al., 1993).

A liberação crônica do GnRH pela deslorelina sobre os receptores gonadotrópicos cria um período de insensibilidade ao GnRH (D’OCCHIO et al., 2000). Esse estado transitório de insensibilidade diminui as gonadotropinas de apoio ao crescimento e maturação do folículo. Coletivamente, o uso de uma dose baixa de deslorelina, resulta em função luteal normal ou melhorada (AMBROSE et al., 1998), associada a uma supressão transitória no desenvolvimento do folículo, o que pode aumentar a fertilidade. (AMBROSE et al., 1998; RAJAMAHENDRAN et al., 1998; BARTOLOME et al., 2004).

## **2. OBJETIVOS**

- Avaliar o efeito do acetato de deslorelina no crescimento folicular em protocolos de IATF.
- Verificar o efeito do acetato de deslorelina na indução da ovulação em protocolos de IATF.
- comparar as taxas de prenhez entre diferentes protocolos de IATF.
- Comparar as taxas de progesterona após a ovulação.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DINÂMICA FOLICULAR

O período do ciclo estral dos bovinos contém em média 21 dias, com variações de 17 a 24 dias, e apresenta geralmente, uma ou duas ondas de crescimento folicular não ovulatórias e uma onda ovulatória. Para o padrão de duas ondas, a primeira começa no dia 0 (dia da ovulação) e a segunda no dia 10, e para o padrão de três ondas, as emergências ocorrem em média, nos dias 0, 9 e 16, sendo as duas primeiras anovulatórias (GINTHER et al., 1996). O número de ondas por ciclo estral parece estar associado com o comprimento do ciclo e com a duração da fase luteínica (GINTHER et al., 1989). Figueiredo et al. (1997) comentaram sobre a existência de uma variabilidade individual nos dias de emergência de cada onda, ainda que não haja diferenças na fertilidade de animais que apresentam duas ou três ondas. Adicionalmente, citam ainda que a quantidade de ondas foliculares e os dias do período interovulatório podem variar entre os animais e, também, em um mesmo animal.

Além disso, em bovinos, o número de ondas foliculares pode ser modificado pela estação do ano, dieta ingerida, ordem de parição, estágio lactacional e outros fatores ambientais (MURPHY & MARTINUK, 1991; LUCY et al., 1992).

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário é conhecido como dinâmica folicular ovariana, o que envolve o desenvolvimento sincrônico de um grupo de folículos, denominado onda folicular (GINTHER et al., 1989). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em todos os estágios da vida de uma fêmea, no período anterior à puberdade (ADAMS et al., 1992) durante a gestação (GINTHER et al., 1996) e no pós-parto (MURPHY et al., 1990; SAVIO et al., 1990).

A emergência da onda folicular é caracterizada por um crescimento sincrônico de mais de 20 pequenos folículos com diâmetro a partir de 2 mm (CARVALHO et al., 2008; ERENO, 2008; GINTHER et al., 1989, ALVAREZ et al., 2000). O número de folículos recrutados em novilhas zebuínas geralmente é maior que nas taurinas (CARVALHO et al., 2008; ALVAREZ ET al., 2000). Gong et al.(1996) acreditam que o número de folículos que emergem numa onda de crescimento está diretamente relacionado aos níveis circulantes de IGF-1 (Fator de crescimento ligado à insulina), e que vacas tratadas com hormônio do crescimento [somatotropina bovina (bST)] podem

aumentar o número de folículos recrutados. Além disso, existem indicações de que os animais *Bos indicus* apresentam níveis circulantes mais elevados de IGF-1 (ALVAREZ et al., 2000). Desta forma, foi sugerido que os maiores níveis de IGF-1 plasmáticos encontrados nestes animais, seria uma das razões para a grande atividade folicular durante a emergência da onda (CARVALHO et al., 2008).

Cada onda folicular é precedida por um aumento nas concentrações circulantes de FSH (ADAMS et al., 1992). Após a emergência da onda, enquanto os folículos continuam a crescer, os níveis de FSH vão declinando até atingirem níveis basais (GINTHER et al., 1997). Essa queda nas concentrações de FSH se dá pela ação do estradiol (E2) e da inibina secretados pelos folículos em crescimento (GINTHER et al., 1996).

Aproximadamente 2,5 a 3 dias após a emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro de 6,2 a 8,4 mm para fêmeas zebuínas (*Bos indicus*) (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008) e cerca de 8,5 mm para fêmeas taurinas (*Bos taurus*) (GINTHER et al., 1996) ocorre o evento denominado de desvio folicular (GINTHER et al., 2001a). Desta forma, um folículo continua a crescer e se torna dominante, enquanto os demais folículos, denominados subordinados, sofrem regressão (MAPLETOFT et al., 2000).

Os mecanismos envolvidos no processo de desvio folicular são complexos e não compreendidos completamente. Sabe-se que neste momento as concentrações de FSH encontram-se em níveis basais (GINTHER et al., 1997). Fatores intrafoliculares também são candidatos à ativação deste processo, tais como sistema IGF, esteróides, os peptídeos ativina A e inibina A, receptores para gonadotrofinas entre outros (BERISHA et al., 2003, FORTUNE et al., 2004, IRELAND, 2004).

A expressão do LHR (receptor do hormônio luteinizante), em novilhas da raça Holandesa, foi detectada nas células da granulosa de folículos  $\geq 8$  mm (BAO et al. 1997; BEG et al. 2001), cerca de 8 horas antes do desvio folicular (BEG et al., 2001), o que levou ambos os autores, a sugerir que o início da expressão do LHR nas células da granulosa seria a causa para a seleção e conseqüentemente para a aquisição da dominância folicular. Entretanto, Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e Ereno (2008) utilizando RT-PCR, não detectaram a expressão do LHR no futuro folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. Recentemente, Nogueira et al. (2007) e Ereno (2008), verificaram que a expressão do LHR em células da granulosa de fêmeas da raça Nelore ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular.

Portanto, estes últimos achados não corroboram a hipótese de que expressão de LHR em células da granulosa ocorre antes da divergência folicular.

Está bem documentado que o estrógeno endógeno produzido pelos folículos ovarianos acentua a amplitude dos pulsos de LH durante a fase folicular do ciclo estral, através do aumento de receptores do hormônio liberador de LH na pituitária anterior e do consequente aumento da capacidade estrogênica dos folículos pré-ovulatórios (STUMPF et al., 1989). Esse mecanismo de retroalimentação positiva entre o E2 e o LH é crítico no processo de maturação final do folículo ovulatório, induzindo o comportamento estral e a ovulação (FIKE et al., 1997).

No início da fase de recrutamento folicular, os dois maiores folículos apresentam uma taxa de crescimento semelhante, mas após o desvio folicular, o folículo subordinado tem sua taxa de crescimento reduzida (GINTHER et al., 2001b; ERENO, 2008). Em vacas holandesas, a taxa de crescimento do folículo dominante (FD) variou de 1,5 a 2,1 mm/dia antes do desvio (KULIK et al., 1999; GINTHER et al., 1997; GINTHER et al., 2001b) enquanto em nelores variou de 0,9 a 1,4 mm/dia (CASTILHO et al., 2007; SARTORELLI et al., 2005).

Na presença de um corpo lúteo funcional e de níveis de P4 acima de 1 ng/mL, esse primeiro FD não é capaz de induzir o pico de LH, e nem provocar comportamento de estro e ovulação (FORTUNE, 1993). Segundo Roberson et al. (1989), na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona (acima de 5 ng/mL) há decréscimo na frequência de pulsos de LH. Desta forma, o folículo dominante acaba sofrendo atresia e não ovula. A presença do CL caracteriza a fase lútea do ciclo estral. Nesta fase, o CL produz P4 em quantidades crescentes do quarto ao décimo dia do ciclo estral e a secreção se mantém estável até que ocorra a luteólise, entre o 15º e o 20º dia (HAFEZ, 1993). O LH secretado pela adeno-hipófise é regulado pela P4 e E2 ovarianos. Durante a fase lútea do ciclo estral, ambos os hormônios inibem a secreção de LH por retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (CLARKE, 1988).

Após a luteólise a concentração plasmática de P4 regride a valores abaixo de 1 ng/mL, permitindo um aumento na frequência dos pulsos de LH (WILTBANK et al., 2002). O aumento na frequência dos pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que passa a secretar quantidades crescentes de E2 (FORTUNE et al., 2001). O E2, na ausência de P4, estimula a síntese de receptores de GnRH na hipófise tornando-a mais sensível ao GnRH ao mesmo tempo em que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (HANSEL & CONVEY, 1983) e estimula a síntese de



gonadotrofinas, resultando no pico de LH e conseqüente ovulação do folículo dominante (HURNIK, 1987).

Carvalho et al. (2008), utilizando animais sincronizados com dispositivo intravaginal contendo P4, constataram que o diâmetro máximo do FD foi menor em novilhas *B. indicus* quando comparadas às *B. taurus* ( $9,5\pm 0,5$  mm vs  $11,6\pm 0,5$ mm), assim como a taxa de crescimento do folículo dominante nas novilhas zebuínas foram menores do que aqueles encontrados nas raças europeias ( $0,9\pm 0,1$ mm/dia vs  $1,1\pm 0,1$  mm/dia, respectivamente). Por isso, concluíram que o menor tamanho do FD está diretamente relacionado à sua menor taxa de crescimento.

### 3.2 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO

O principal mecanismo de regulação do ciclo estral é a regressão do CL, que normalmente ocorre nas fêmeas bovinas ao redor do dia 16 a 18 do ciclo. Assim sendo, o CL é um fator chave em vários processos reprodutivos, tais como a ovulação e a duração do ciclo estral (MILVAE et al., 1996). As formas de controle do ciclo estral em bovinos estão baseadas na extensão ou redução da fase luteínica, utilizando progestágenos ou prostaglandinas, e na alteração da onda folicular, utilizando E2 ou GnRH (BURKE et al., 1996).

### 3.3 SINCRONIZAÇÃO COM PGF $2\alpha$

A PGF $2\alpha$  causa regressão do corpo lúteo durante a fase do ciclo estral quando há responsividade a este fármaco. Tal responsividade inicia-se no 5º dia do ciclo estral, aumenta até o 12º dia e permanece em fase de platô até o 17º dia, quando se inicia a regressão espontânea pela prostaglandina endógena (ODDE, 1990). A partir do momento em que ocorre a regressão do corpo lúteo, o próximo folículo dominante presente terá capacidade ovulatória (KASTELIC et al., 1990). Verificou-se que o intervalo entre a administração e a ovulação foi de três dias, quando o tratamento com prostaglandina foi realizado no 5º dia do ciclo estral, momento no qual o folículo dominante da primeira onda ainda está em fase de crescimento. No caso do tratamento iniciar-se no 12º dia do ciclo estral, o folículo dominante da segunda onda encontra-se

no início da fase de crescimento e a ovulação ocorre 4,5 dias após a aplicação. Em bovinos tratados no 8º dia do ciclo estral, ocorre frequentemente a ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular quatro dias após a aplicação de prostaglandina. No entanto, ocasionalmente pode ocorrer a ovulação do segundo folículo dominante seis dias após o tratamento (KASTELIC & MAPLETOFT, 1998).

Teoricamente, duas aplicações de prostaglandina, com intervalos de 11 a 14 dias, induzem o estro em grande parte das fêmeas ciclando, enquanto fêmeas em anestro ou ciclando irregularmente não respondem ao tratamento. Portanto, tais programas nem sempre proporcionam alto grau de sincronização ou alta taxa de prenhez (CAVALIERI et al., 1997; BARROS, 2000).

### 3.4 GnRH

O tratamento com GnRH induz a ovulação do folículo dominante, através da liberação hipofisária do LH. Em torno de 2 horas após sua administração, ocorre pico de LH e 24 a 32 horas é induzida a ovulação do FD, iniciando uma nova onda cerca de 2 dias após a aplicação (PURSLEY et al., 1995).

O emprego do GnRH tem efeitos variáveis na função do corpo lúteo, dependendo do momento do ciclo no qual o tratamento é iniciado. O uso do GnRH, próximo ou junto à onda pré-ovulatória de LH, atenua as concentrações de progesterona em soro durante os primeiros 7 dias do ciclo. De forma similar, a exposição de um corpo lúteo em desenvolvimento (dia 2 do ciclo) a secreção de LH, induzida pelo GnRH, causa um decréscimo nas concentrações de progesterona durante o ciclo. A aplicação de GnRH ao estro eleva a proporção de células luteais grandes no corpo lúteo ao dia 10 do ciclo. Por outro lado, a função e desenvolvimento folicular podem ser também regulados pelo emprego de GnRH ou de seus análogos durante a fase luteal do ciclo estral (THATCHER et al., 1993).

Em resposta ao GnRH, o maior folículo existente sofre ovulação ou continua sua regressão por atresia, dependendo do seu estágio de desenvolvimento. O GnRH ou seus análogos induzem a ovulação e formação de um corpo lúteo em fêmeas durante a fase luteal inicial como também, em aquelas sem um corpo lúteo funcional ( $P4 < 1\text{ng/ml}$ ), no momento do tratamento. A onda de LH induzida pelo GnRH é responsável pela ovulação de um folículo funcionalmente dominante em sua fase de crescimento. Essa

ovulação induzida é associada a um decréscimo na concentração de estradiol similar ao acontecido quando da destruição do folículo (TWAGIRAMUNGU et al., 1995). Causando a ovulação, a ocorrência de estro espontâneo é inibida. O tratamento com o GnRH altera o diâmetro de um folículo dominante durante a sua fase de crescimento, porém, não na sua fase de regressão. Assim, o GnRH não muda o destino do folículo já comprometido a atresia. Independentemente do estágio ovariano ao tratamento, uma nova e sincronizada onda de crescimento folicular (5 a 10mm) emerge 2 dias após a aplicação do GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995).

### 3.5 SINCRONIZAÇÃO COM PROGESTERONA/PROGESTÁGENOS ASSOCIADO AO ESTRADIOL

A ação da progesterona na sincronização do ciclo estral em bovinos tem sido relatada há décadas (GORDON, 1976). Os animais recebiam injeções diárias em doses variadas por períodos de até 20 dias. Estes tratamentos resultavam em altas taxas de sincronização do estro, no entanto, apresentavam baixa fertilidade e pouca praticidade, decorrente das aplicações diárias do hormônio. Com o passar do tempo foram desenvolvidos outros métodos de administração de progesterona (MACMILLAN & PETERSON, 1993).

A sincronização com progestágenos baseia-se no princípio de que essas substâncias exógenas possam manter uma concentração sanguínea subluteal de progestágeno, durante o período necessário a permitir a regressão do corpo lúteo. Em ausência de um corpo lúteo, a retirada da fonte de progestágeno resultará em um estro sincronizado (MACMILLAN & PETERSON, 1993). Os progestágenos atuam simulando a presença de um corpo lúteo funcional, provocando uma retro alimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas levando de 5 a 6 dias após sua suspensão a manifestação de estro, a qual é continuada por ciclos estrais normais (GALINA ET AL., 1996).

Os dispositivos intravaginais de progesterona e o Benzoato estradiol (BE) têm sido amplamente utilizados em programas de sincronização da ovulação para IATF tanto em vacas de corte quanto em vacas de leite (BÓ et al., 2002). O tratamento consiste na administração de 2 mg de BE no momento da inserção do dispositivo intravaginal de P4 (Dia 0), retirada do dispositivo e administração de PGF i.m. no Dia 7

ou 8, e 1 mg de BE i.m. 24 horas mais tarde (MACMILLAN; BURKE, 1996). Em contraste com diversos relatos que recomendam a sincronização da ovulação com injeção de BE 24 h após a remoção do dispositivo (BÓ et al., 2002; MARTINEZ et al., 2005; BARUSELLI et al., 2004) outros estudiosos demonstraram a possibilidade de utilizar o Cipionato de estradiol (CE) no momento da retirada da fonte de progesterona/progestágeno objetivando minimizar o número de manejos (COLAZO et al., 2003; MARQUES et al., 2005; PENTEADO et al., 2005; AYRES et al., 2006) e obter taxas de prenhez similares ao BE (MARQUES et al., 2004; PENTEADO et al., 2005; AYRES et al., 2006).

Uma das vantagens dos tratamentos baseados no emprego de progesterona e/ou progestágenos, é a sincronização de estro em fêmeas cíclicas e a indução na retomada da ciclicidade de vacas em anestro. O tratamento de fêmeas em lactação no pós-parto com progestágenos exógenos mantém o folículo dominante para que o mesmo alcance sua maturação final e ovule após a retirada do hormônio (YAVAS & WALTON, 2000).

### 3.6 EMPREGO DA eCG EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO NA ESPÉCIE BOVINA

Um fármaco que pode contribuir para o aumento do crescimento final do folículo pré ovulatório é a gonadotrofina coriônica equina (eCG). A eCG é uma gonadotrofina glicoprotéica produzida pela placenta de equinos durante a gestação (COMBARNOUS, 1992).

Uma característica importante da molécula de eCG é a existência de grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa) principalmente a N-acetil neuramina (ou ácido siálico), primordialmente presente na subunidade  $\beta$  da molécula de eCG, o que proporciona uma grande meia vida a este composto químico (MURPHY; MARTINUK, 1991). Quando administrada em outras espécies, a eCG se liga aos receptores de FSH e de LH, sendo a única gonadotrofina capaz de se ligar simultaneamente a esses dois receptores, exceto nos equinos (MURPHY & MARTINUK, 1991). Na égua o eCG estimula a formação das glândulas luteais acessórias para auxiliarem na manutenção da gestação (GINTHER, 1996). Nos bovinos essa gonadotrofina apresenta longo tempo de ação, variando de 50 a 100 horas, devido à

proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente na sua molécula (SCHAMS ET al., 1978).

Em estudos recentes, SILVEIRA et al. (2005) procurando desenvolver um sistema hormonal de indução de estro, avaliaram o melhor momento da aplicação do BE e eCG nessa associação. O emprego do eCG busca permitir um maior crescimento folicular compatível com uma melhor resposta ovulatória ao GnRH possibilitando, assim, o emprego de IATF. Para isso, foi realizado a dinâmica folicular do sistema hormonal desenvolvido (medroxiprogesterona (MAP) + BE + eCG + GnRH), verificando-se que o emprego do eCG, nas 24h da retirada do MAP, possibilitou um maior crescimento folicular, resultando em uma diferença na curva de crescimento e um maior diâmetro do folículo dominante ao momento do emprego do GnRH, comparado aos demais grupos ( $P=0.0001$ ). Os folículos alcançaram um diâmetro médio de 13mm nas 72h da aplicação do eCG (SILVEIRA ET AL., 2005).

Na mesma oportunidade os autores, baseando-se em que a ação do eCG e dose dependente, procuraram avaliar o desempenho de diferentes doses dessa gonadotrofina exógena. Foram testadas as doses de 300UI, 400UI e 500UI aplicadas no mesmo momento (24h da retirada do MAP). Os resultados de prenhez nos grupos (G300 = 76.9%, 70/91; G400 = 80.0%, 68/85; G500 = 79.2%, 76/96; não mostraram diferença significativa. A manifestação média de estro dos grupos, nas 48h da retirada do MAP, ficou em 55.9% (152/272) e a ocorrência de partos gemelares em 4.4% (12/272). A possibilidade da redução da dose de eCG (300UI) permite diminuir os custos do sistema empregado, sem comprometimento do seu desempenho (SILVESTRE ET AL., 2005).

Tendo em vista esses aspectos, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o desenvolvimento folicular e a taxa de prenhez influenciados pelo uso do agonista GnRH acetato de deslorelina em vacas leiteiras de alta produção, submetidas a protocolos para IATF.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E MANEJO

O presente estudo foi dividido em dois experimentos: Experimento A (n = 20) e Experimento B (n = 52) em duas fazendas distintas, porém, pertencentes à região de Cascavel – Paraná. Foram utilizadas vacas da raça Holandesa Preto e Branca em lactação, com média de 45 dias pós-parto. Os animais de ambas as propriedades, encontravam-se com escore da condição corporal 3.5, segundo classificação de EDMONDSON et al. (1989). A alimentação baseou-se a pasto (*Brachiaria brizantha*) e em silagem de milho misturada a concentrado de soja e milho, estando o sal mineral à disposição dos animais, em cochos dispostos nos piquetes e na sala de alimentação com canzil (experimento A 1), e preponderantemente em silagem de milho *ad libitum*, misturada a concentrado de soja e milho, estando o sal mineral à disposição dos animais, em cochos dispostos no *free-stall*. Todos os animais passaram por prévio exame ginecológico anteriormente ao início do trabalho para descartar o uso de animais com problemas reprodutivos.

### 4.2 PLANO EXPERIMENTAL

A primeira etapa (A) do experimento foi realizada em uma propriedade associada à COOPAVEL (Cooperativa Agroindustrial de Cascavel), município de Cascavel (PR) – Brasil, nos meses de março a abril de 2010. Vinte vacas da raça Holandesa Preto e Branca foram sincronizadas com 2 mg de benzoato de estradiol (BE) – Cronibest<sup>®</sup>/Biogenesis Bago, Curitiba - (PR), e um dispositivo intravaginal de silicone inerte contendo 558 mg de progesterona natural – Cronipres monodose<sup>®</sup>/Biogenesis Bago, Curitiba (PR), no D0. No dia da retirada do dispositivo de progesterona (D8), todas as vacas receberam um tratamento com 0,150 mg de d-cloprostenol – Croniben<sup>®</sup>/Biogenesis Bago, Curitiba (PR). Simultaneamente no D 8, os animais foram homogeneamente divididos em dois grupos: Grupo controle (G1), que não recebeu nenhum tratamento ao D 8, e um Grupo tratamento (G2), o qual contava com a aplicação de acetato de deslorelina 100 µg solução aquosa (UNESP - Botucatu - SP) pela via intramuscular (IM) no D 8. No dia 10 do esquema de sincronização, todas as

vacas receberam 100 µg de acetato de deslorelina solução aquosa (UNESP - Botucatu - SP) IM, para que no dia 11(D 11), fossem inseminadas artificialmente em tempo fixo, 24 horas após a aplicação do agonista GnRH. As seqüências de tratamentos hormonais para os grupos experimentais estão representadas nas Figuras 3 e 4.

### G1: CONTROLE

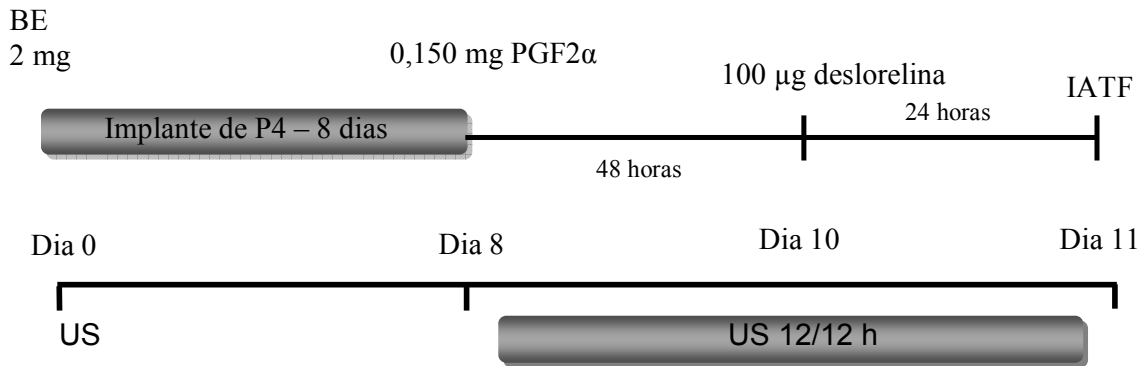


Figura 3 – Diagrama esquemático do Experimento A para o grupo 1 (G1); D0: animais receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.

### G2: TRATAMENTO

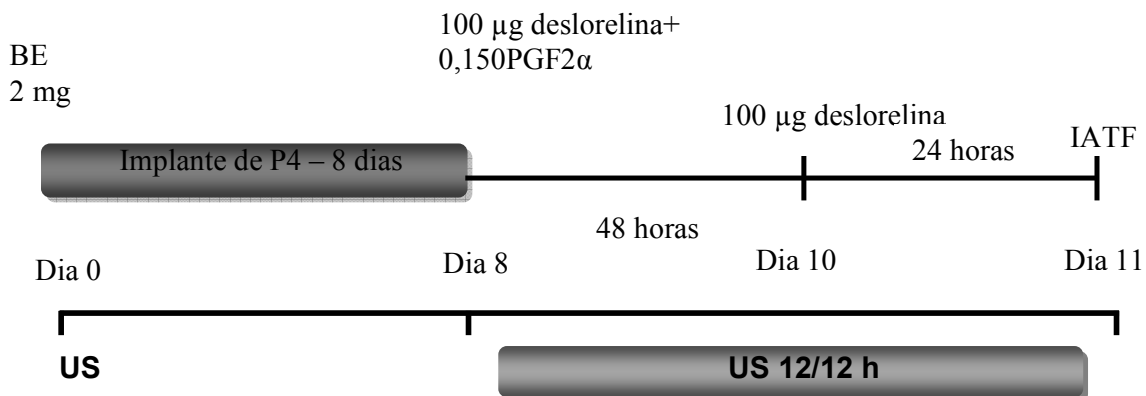


Figura 4 – Diagrama esquemático do Experimento A para o grupo 2 (G2); D0: animais receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol + 100 µg de acetato de deslorelina; D10: administração de 100 µg de

acetato de deslorelina; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.

O experimento B, foi conduzido no período de 08/08/2010 a 10/09/2010. Todos os animais receberam o mesmo tratamento descrito para o experimento (A) até o 8º dia do protocolo. Após a remoção dos implantes de P4, dose do acetato de deslorelina foi modificada para 150 µg e em um veículo de liberação controlada, aplicada no 8º dia do protocolo. No D 8 após a remoção dos implantes de P4, todas as vacas receberam um tratamento com 0,150 mg de d-cloprostenol – Croniben<sup>®</sup>/Biogenesis Bago, Curitiba (PR) e após este procedimento, foram separadas aleatoriamente em dois grupos: controle (G1) o qual recebeu apenas o d-cloprostenol e o grupo tratamento (G2), no qual se administrou 150 µg de acetato de deslorelina. No dia 10 (D 10), ambos os grupos (G 1) e (G 2) receberam por via intramuscular 100 µg de acetato de deslorelina para promover a indução da ovulação, sendo inseminadas artificialmente com sêmen descongelado, 24 horas após a aplicação da deslorelina, no dia 11 do protocolo (D 11). As sequências de tratamentos hormonais para os grupos experimentais estão representadas nas Figuras 5 e 6.

### G1: CONTROLE

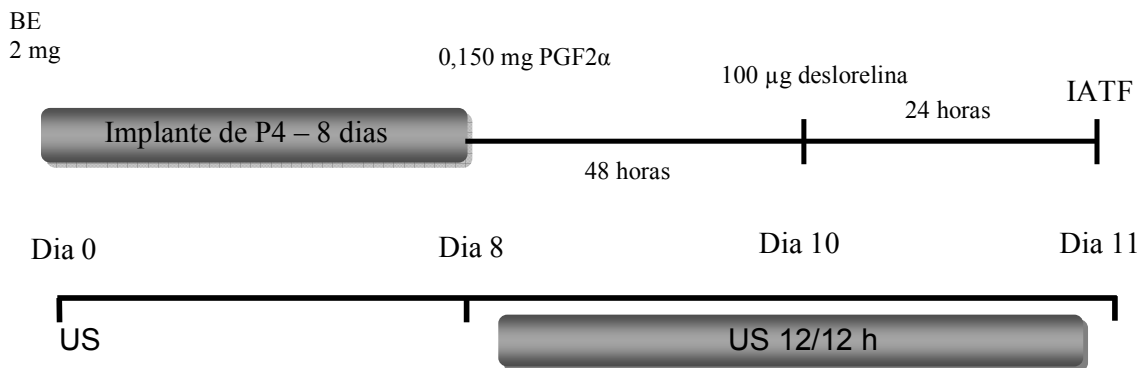


Figura 5 – Diagrama esquemático do Experimento B para o G1; D0: animais receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina solução aquosa; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.



## G2: TRATAMENTO

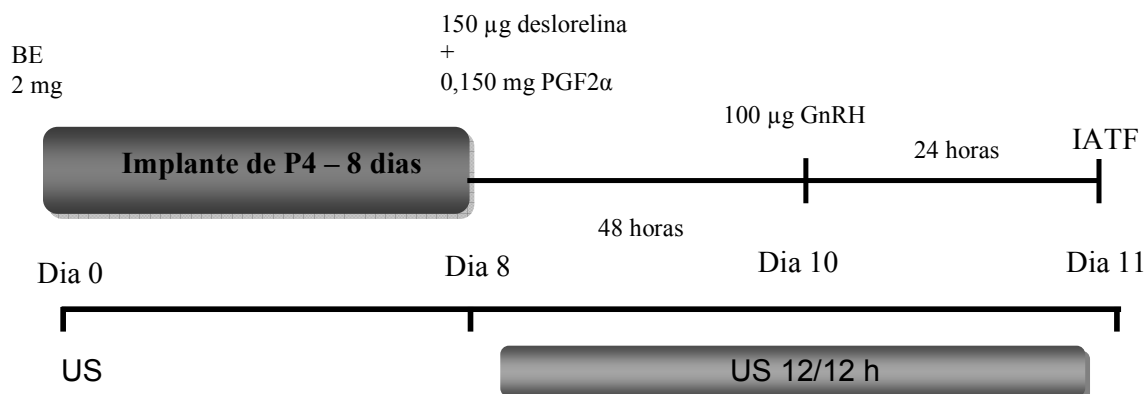


Figura 6 – Diagrama esquemático do Experimento B para o G2; D0: todos os grupos receberam 2mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal contendo 558 mg de progesterona; D8: retirada do dispositivo, administração de 0,150 mg de d-Cloprostenol + 150 µg de acetato de deslorelina liberação controlada; D10: administração de 100 µg de acetato de deslorelina solução aquosa; D11: IATF; Foram realizadas análises ultrassonográficas a cada 12 horas do D8 ao D12 ou até a ovulação.

### 4.3 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS

As avaliações ultrassonográficas transretais foram realizadas com o auxílio do aparelho (SSD 550 ALOKA transdutor linear 5MHz – Japão), nos dias 0 e 8, e a cada 12 horas a partir da retirada do dispositivo até a ovulação, que foi definida como o desaparecimento do folículo dominante identificado na avaliação anterior.

### 4.4 DOSAGEM HORMONAL

Para a dosagem de LH e FSH, as coletas aconteceram a cada três horas (total de 4 coletas no experimento A e 7 coletas no experimento B) tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratamento, após a primeira aplicação do acetato de deslorelina. As amostras de sangue foram coletadas na veia mamária e armazenadas em tubos coletores de vidro a vácuo (Vacutainer - BD® - EUA) que posteriormente foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos, sendo o soro depositado em tubos tipo *Eppendorf* (2ml),

previamente identificados com o número de cada animal e acondicionados a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem hormonal para (LH e FSH) feita por radioimunoensaio (Kit para LH e FSH – RIA *Diagnostic Products Corporation*, Los Angeles, CA), realizado em parceria com a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Araçatuba (SP). A coleta de sangue para P4 foi realizada durante todos os dias do protocolo dos dois experimentos, contudo, acontecia apenas uma vez ao dia e antes da aplicação de cada hormônio. Os animais do experimento B participaram de coletas de sangue para dosagem de P4 adicionais ao 3º e 7º dia pós IATF.

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa específico (GraphPad Prism 5, Califórnia – E.U.A.) As variáveis: diâmetro do folículo pré-ovulatório, tamanho do CL a retirada do dispositivo intravaginal e as taxas de concepção, foram analisadas pelo teste de “T” e as diferenças entre os tratamentos foram detectadas pelo "Mann Whitney Test". As dosagens hormonais foram submetidas à análise de variância tendo as diferenças entre tratamentos avaliados pelo "Kruskal-Wallis statistic". A taxa de prenhez foi analisada pelo teste do “Chi” Quadrado. Foi utilizado como nível de significância  $P < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 EXPERIMENTO A

Mediante análise ultrassonográfica, escolhemos animais que não apresentavam nenhuma ou pouca atividade ovariana. A média da dosagem para P4 no primeiro dia do protocolo foi de  $0,57 \text{ ng/dL}$  de sangue ( $\pm 0,41$ ), tendo variações ao longo de 8 dias, porém sem significância ( $P=0,0793$ ). Esta dosagem serviu para mostrarmos que os animais encontravam-se com deficiências no retorno da ciclicidade. Em apenas 12 horas após a aplicação da deslorelina, ainda no 8º dia do protocolo, folículos ovarianos que se encontravam com uma média de ( $G1=0,90 \text{ cm} \pm 0,15 \text{ mm}^a$ ) e ( $G2=0,84 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ mm}^a$ ),

evoluíram para ( $G1=0,99 \text{ cm} \pm 0,17 \text{ mm}^a$ ) e ( $G2=1,25 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ mm}^b$ ), um aumento significativo para o grupo tratado, sendo  $P = 0,0001$ , mostrado na Figura 7. Ao 9º dia do protocolo, o acompanhamento da dinâmica folicular pelo ultrassom, não evidenciou mais a presença dos folículos ovarianos concluindo-se então, que o acetato de deslorelina em solução aquosa na dose de  $100 \mu\text{g}$  antecipou a ovulação de todos os animais do G 2, após sua administração no 8º dia do protocolo. Este fato ocorreu devido à liberação súbita de LH que o fármaco promoveu três horas após sua administração no grupo G2, que pôde ser evidenciado pela dosagem hormonal apresentada na Tabela 1. Como os animais tratados com a deslorelina já haviam ovulado, não foram submetidos à IATF. Finalizou-se o protocolo apenas nas vacas do grupo tratamento e que foram posteriormente, submetidas à IATF, e que apresentaram folículos pré-ovulatórios com média de  $1,68 \text{ cm} (\pm 0,46)$  e averiguadas 30 dias depois ao diagnóstico de gestação, no qual as taxas de prenhez chegaram a 40% (4 de 10 animais). As diferenças nas concentrações séricas de FSH e LH ao dia da indução da ovulação são observadas na Tabelas 2.

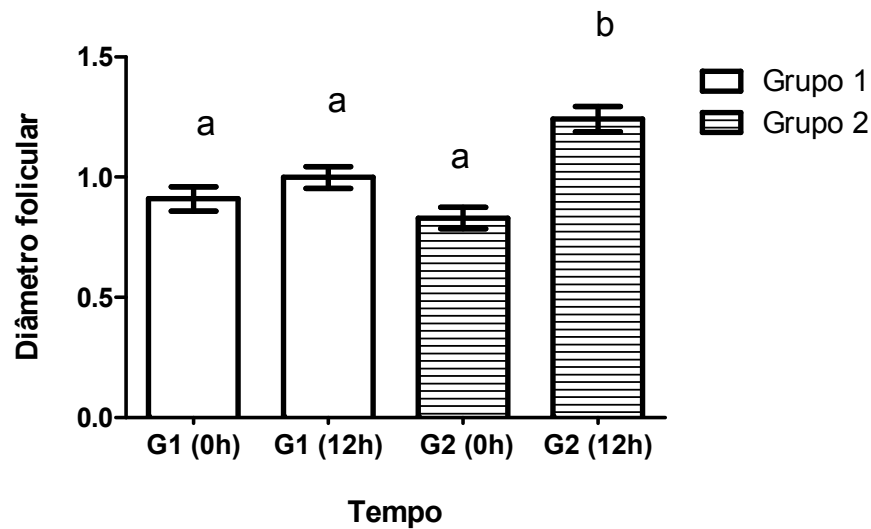


Figura 7 – Efeito do acetato de deslorelina  $100 \mu\text{g}$  em solução aquosa (Média + Desvio padrão), sobre o diâmetro folicular dos Grupos controle e Tratamento, 12 horas após a injeção. ( $P=0,0001$ ). Letras distintas representam diferença significativa ( $P<0,05$ ).

Quadro 1 – Médias e desvios-padrão da concentração sérica de FSH e LH determinados no dia 8 do protocolo com 0, 3, 6 e 9 horas após a aplicação de 100 µg de deslorelina.

Coletas (3/3 h)	Média da dosagem (ng/dL)				Média da dosagem (ng/dL)			
	(FSH)		(LH)		(FSH)		(LH)	
	G 1	D P	G 2	D P	G 1	D P	G 2	D P
<b>0</b>	1,6850 <sup>a</sup>	± 0,22	1,4344 <sup>a</sup>	± 0,17	1,3676 <sup>a</sup>	± 0,34	1,8734 <sup>a</sup>	± 0,22
<b>3</b>	1,5325 <sup>a</sup>	± 0,14	3,3111 <sup>b</sup>	± 0,90	1,4510 <sup>a</sup>	± 0,37	12,001 <sup>b</sup>	± 0,96
<b>6</b>	1,6142 <sup>a</sup>	± 0,18	2,4960 <sup>b</sup>	± 0,62	1,8180 <sup>a</sup>	± 0,36	8,3674 <sup>b</sup>	± 0,63
<b>9</b>	1,7960 <sup>a</sup>	± 0,27	1,7515 <sup>a</sup>	± 0,28	2,8361 <sup>b</sup>	± 1,1	3,3319 <sup>a</sup>	± 0,32

<sup>a,b</sup> Letras distintas representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As análises foram efetuadas comparando-se os grupos G 1 e G 2.

DP = desvio padrão

Quadro 2 – Médias e desvios-padrão da concentração sérica de FSH e LH determinados no dia 10 do protocolo com 0, 3, 6 e 9 horas após a aplicação de 100 µg de deslorelina para o grupo G1.

Coletas (3/3 h)	Média da dosagem (ng/dL)		Média da dosagem (ng/dL)	
	(FSH)		(LH)	
	G 1	D P	G 1	D P
<b>0</b>	1,7867 <sup>a</sup>	± 0,32	1,6727 <sup>a</sup>	± 0,33
<b>3</b>	2,5770 <sup>b</sup>	± 0,96	5,2628 <sup>b</sup>	± 1,93
<b>6</b>	1,9890 <sup>a</sup>	± 0,46	2,3176 <sup>b</sup>	± 0,41
<b>9</b>	1,9701 <sup>a</sup>	± 0,44	1,7662 <sup>a</sup>	± 0,30

<sup>a,b</sup> Letras distintas representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). As análises foram efetuadas comparando-se os grupos G 1 e G 2.

DP = desvio padrão

## 5.2 EXPERIMENTO B

No D8 do protocolo, a média dos folículos não ultrapassou  $0,62 \pm 0,11$  para G1 e  $0,51 \pm 0,08$  para G2. Houve diferenças significativas entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório de vacas tratadas ou não com acetato de deslorelina  $150 \mu\text{g}$  em veículo de liberação controlada no 8º dia do protocolo de sincronização de estro. A média do diâmetro do folículo pré-ovulatório com seu respectivo desvio padrão para o G 2 foi de  $1,72 \text{ cm} (\pm 0,11)$  em relação ao G1, onde a média foi de  $1,57 \text{ cm} (\pm 0,08)$  estando representadas na Figura 8. Esses valores diferiram estatisticamente sendo  $p=0,0001$ .

O grupo tratamento apresentou maior taxa de prenhez em relação ao grupo controle, G 2 ( $57,69 \%$ ;  $15/26$ ) x G 1 ( $34,61 \%$ ;  $9/26$ ), como ilustrado na Figura 9.

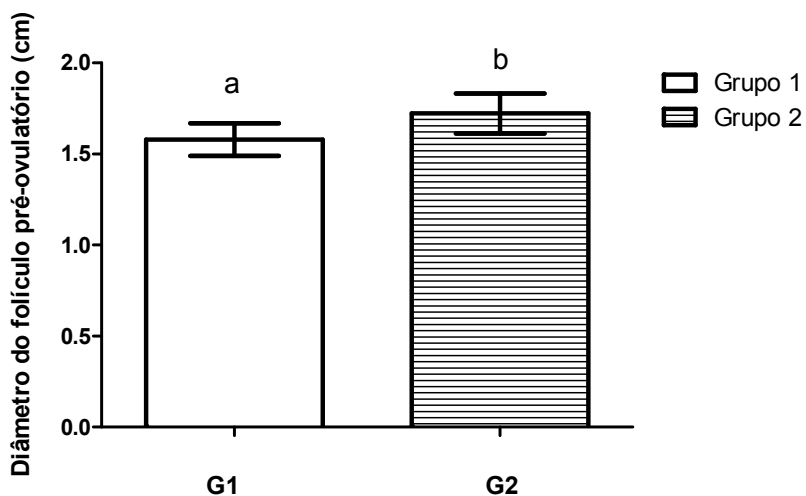


Figura 8 – Efeito do tratamento com acetato de deslorelina  $150\mu\text{g}$  em veículo de liberação controlada, sobre o diâmetro do folículo pré-ovulatório de vacas leiteiras de alta produção tratadas e não tratadas com acetato de deslorelina  $150 \mu\text{g}$ . ( $P=0,0001$ ). Letras distintas representam diferença significativa ( $P<0,05$ ).

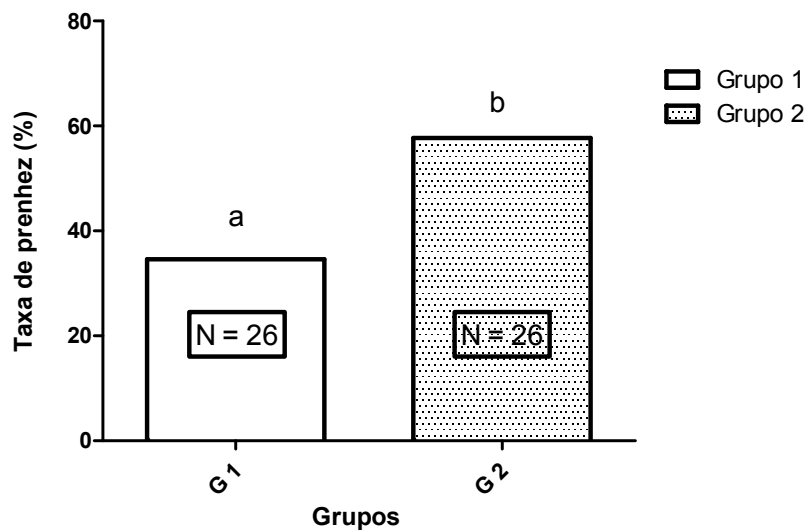


Figura 9 – Taxa de prenhez de vacas leiteiras de alta produção tratadas e não tratadas com acetato de deslorelina 150 $\mu$ g em veículo de liberação controlada. Letras distintas representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Mesmo com picos altos de LH, 3 horas após a administração de deslorelina no dia 8 (Figura 10), os dois grupos seguiram com um desenvolvimento folicular normal, ou seja, sem ocorrer à ovulação precoce.

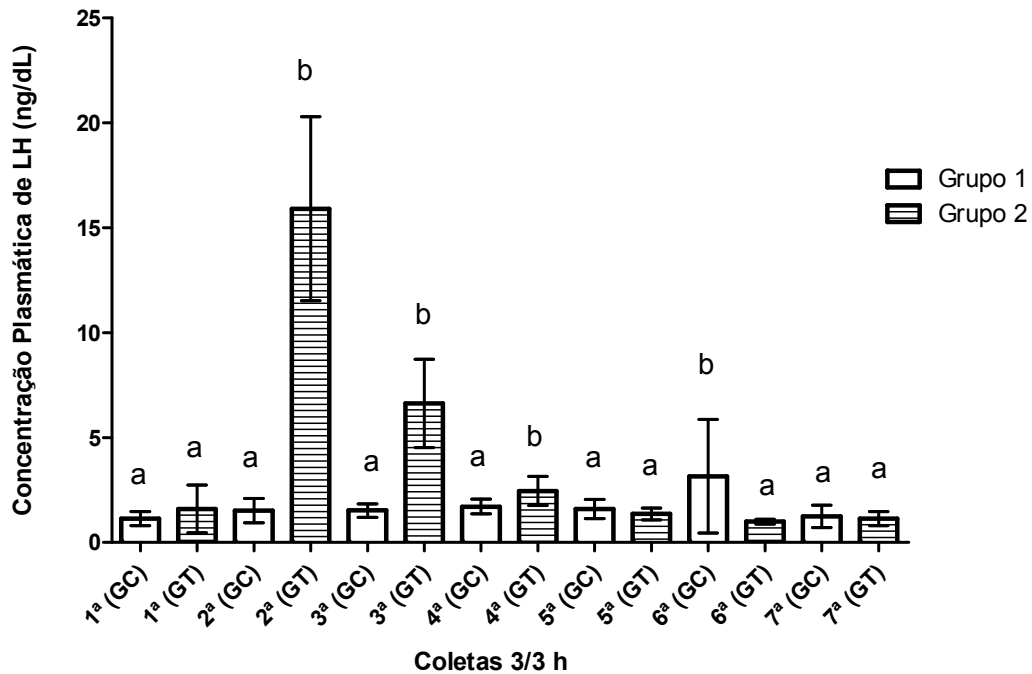


Figura 10 – Efeito do acetato de deslorelina 150µg em veículo de liberação controlada, em vacas leiteiras de alta produção sobre as concentrações plasmáticas de LH. Letras distintas representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Três e sete dias após a inseminação artificial, as concentrações plasmáticas de progesterona (Figura 11), aumentaram significativamente ( $P = 0,0283$ ) nos animais do grupo tratado em relação ao controle.

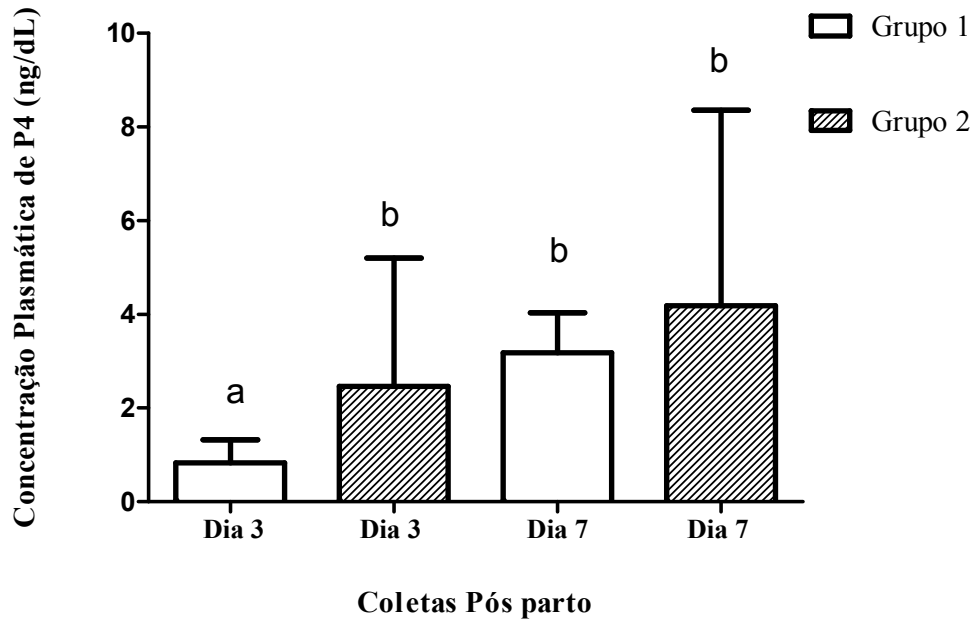


Figura 11 – Concentração plasmática de P4 3 e 7 dias após a ovulação nos grupos controle e tratado com 150  $\mu$ g de acetato de deslorelina em veículo de liberação controlada. Letras distintas representam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos que a associação do acetato de deslorelina em protocolos a base de progestágenos, estradiol e prostaglandinas favoreceu o desenvolvimento folicular ovariano bem como a ovulação de vacas em anestro, concordando com Thacher et al., (2002) onde as respostas obtidas, dependem em muito, do estado fisiológico em que os animais se encontram.

Uma característica importante de protocolos que envolvem o uso de agonistas do GnRH é que o tempo para inseminação é determinado em relação à aplicação do fármaco, ou seja, não há necessidade da detecção do cio (D'OCCHIO et al., 1997). Para o nosso protocolo, também não se fez necessária a observação de cio.

Frente a ovulação, a eficácia do acetato de deslorelina dentro de outros protocolos de sincronização de estro já é provada como indutora da ovulação como podemos observar em trabalhos realizados por Santos et al., (2004), que ao utilizá-la na forma de implantes contendo 450 µg e 750 µg dentro do protocolo Ovsynch, fora a indução, demonstraram o potencial do fármaco sobre a função lútea, aonde a concentração sérica de progesterona chegou a 7,44 ng / ml, 11 dias após a inseminação artificial, havendo também, o provimento da manutenção da gestação, o que também observamos em nosso experimento quando dosamos a concentração plasmática de progesterona após a inseminação artificial.

Ainda sobre a indução da ovulação, esta pesquisa encontra-se em acordo com Bartolome et al., (2004), onde em seu trabalho, obteve a indução da ovulação com doses ajustadas de acetato de deslorelina (1000 µg e 750 µg) na forma de implantes subcutâneos, que estimularam o desenvolvimento lúteo e regressão do crescimento folicular, garantindo a sobrevivência embrionária e focando também, o reajuste de doses para se minimizar anormalidades nos próximos ciclos.

Doses muito elevadas como as utilizadas por Padula et al. (2002), que administraram 1000µg de deslorelina contida em implantes subcutâneos, obtiveram a redução das amplitudes dos pulsos de LH (devido à baixa regulação dos receptores gonadotrópicos ao GnRH), induzindo o anestro em vacas que eram cíclicas. A mesma situação foi observada anteriormente por Thatcher et al., (2002) com a administração por três dias consecutivos de 100µg de deslorelina. A capacidade da deslorelina em suprimir o crescimento folicular também foi demonstrada anteriormente por Ambrose et al. (1998), Rajamahendran et al. (1998) e Bartolome et al.(2004).

No que diz respeito à função luteal, este experimento demonstrou que o acetato de deslorelina quando aplicado por mais de uma vez dentro do protocolo de sincronização de estro, promoveu um aumento no diâmetro do folículo pré-ovulatório, favorecendo a formação de um corpo lúteo com maior funcionalidade nas vacas do grupo tratado em relação aos animais que receberam apenas a dose indutora da ovulação, estando de acordo com Davis et al. (2003), que administraram um agonista GnRH em vacas taurinas, durante um período de sete dias e em diferentes períodos do ciclo estral, obtendo a melhora da função luteínica e aumento do tamanho do corpo lúteo das vacas tratadas em relação aos animais controle.

Com relação ao desenvolvimento folicular, este experimento demonstrou a eficácia do acetato de deslorelina 150µg em veículo de liberação lenta sobre o crescimento de folículos ovarianos após o desvio. No D 8, quando se realizou a aplicação do acetato de deslorelina, os folículos ovarianos do grupo tratamento apresentavam em média, 0,84 cm de diâmetro, ou seja, no momento, não havia receptores para o LH, o que permitiu melhor atuação do fármaco testado sobre o desenvolvimento dos folículos. Este fato encontra-se em acordo com o descrito por Bó et al., (2000), onde relatam que o LH estimula o AMP cíclico em células da granulosa somente em folículos com mais de 9 mm de diâmetro provando então, que somente nestas dimensões, os folículos adquirem receptores para LH e, portanto capacidade ovulatória.

Fármacos como a eCG também são capazes de promover o desenvolvimento de folículos ovarianos após o desvio como podemos constatar em trabalhos realizados por Perez, (2008) e Baruselli et al., (2004), que relatam um efeito positivo da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em aumentar o tamanho folículo ovulatório, melhorando as taxas de ovulação e prenhez. A capacidade da eCG em se ligar a receptores de LH e FSH pode ser o mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro folicular e da taxa de sincronização (MURPHY et al., 1991).

Uma função lútea melhorada também foi descrita por D'occhio et al., (1998), durante a super estimulação de folículos ovarianos com bioimplantes de deslorelina 450 µg em novilhas zebuínas, onde notaram o aumento do corpo lúteo, 7 dias após a ovulação ocorrer.

Neste experimento, as concentrações séricas de progesterona atingidas pelos animais que receberam o acetato de deslorelina 150 µg em veículo de liberação controlada, nos dias 3 e 7 após a inseminação artificial foi significativa em relação ao

grupo controle, discordando de Santos et al., (2004) onde as concentrações plasmáticas de progesterona não diferiram significativamente entre os grupos tratados com implantes subcutâneos de deslorelina contendo 450 µg ou 750 µg.

Estatisticamente, os resultados encontrados nesta pesquisa diferiram significativamente entre os grupos experimentais. Mesmo diante dos resultados promissores, é de extrema importância que mais pesquisas dando ênfase ao uso de agonistas GnRH, sejam realizadas em um maior número de animais para explorar os efeitos potenciais do acetato de deslorelina sobre a fertilidade e elucidando de uma melhor forma, seu mecanismo de ação em diferentes doses.

## **7. CONCLUSÃO**

Pela análise dos resultados foi possível concluir que:

- 1) o acetato de deslorelina na dose de 100 µg em veículo aquoso, induz um pico elevado de FSH, mas não o mantém. A alta concentração de LH promovida por esta dose faz com que os animais ovulem antes do término do protocolo.
- 2) O acetato de deslorelina na dose de 150 µg em veículo de liberação controlada, no dia 8 do protocolo de sincronização de estro visando a IATF, induz a formação de folículos pré-ovulatórios maiores em relação a animais não tratados.
- 3) As concentrações plasmáticas de P4 3 dias após a ovulação é maior nos animais tratados em relação ao controle.
- 4) Taxas de prenhez maiores são obtidas quando 150 µg de acetato de deslorelina em veículo de liberação lenta são aplicados após tratamento com implantes vaginais a base de P4.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C. H., Ginther, O. J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 94, pág. 177-88, 1992.
- Alvarez, P., Spicer, L. J., Chase JR., C. C., Payton, M. E., Hamilton, T. D., Stewart, R. E., Hammond, A. C., Olson, T. A., Wetteman, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during and estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, pág.1291-1302, 2000.
- Ambrose, J. D.; Pires, M. F. A.; Moreira, F.; Diaz, T.; Binelli, M.; Thatcher, W. W. Influence of deslorelin (GnRH agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 50, pág. 1157–1170, 1998.
- Ayres, H.; Penteado, L.; Torres-Júnior, J. R. S.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, pág. 410, 2006.
- Bao, B., Garverick, H. A., Mith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E., Youngquist, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, pág.1158-1168, 1997.
- Barros, C. M. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em Ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pág. 332, USP, 2000.
- Bartolome, J. A.; Santos, J. E. P.; Pancarci S. M.; Melendez, P.; Arteché A. C. M.; Hernandez O. Induction of ovulation in nonlactating dairy cows and heifers using different doses of a deslorelin implant. **Theriogenology**, v. 61, pág. 407–419, 2004.
- Baruseli, P. S., Reis, E. L., Marques, M. O., Nasser, L. F., Bó, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, pág.479-486, 2004.
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C., Ginther, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.64, pág.432-441, 2001.
- Berisha, B., Sinowatz, F., Schams, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, pág.162-171, 2003.

Bó, G. A., Adams, G. P.; Mapletoft, R. J. Dinâmica folicular ovárica em el bovino. In: MADUREIRA, E.H BARUSELLI, P.S. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo, FUNVET, 2000, pág.12-34.

Bó, G. A.; Baruselli, P. S.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tribulo, R.; Tribulo, H.; Mapletoft, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 57, pág. 53-72, 2002.

Burke, C. R., Macmillan, K. L., Boland, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. **Animal Reproduction Science**, v.45, pág.13-28, 1996.

Carvalho, J. B. P., Carvalho, N. A. T., Reis, E. L., Nichi, M., Souza, A. H., Baruselli, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus x Bos Taurus*, and *Bos Taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, pág.167-175, 2008.

Castilho, C., Garcia, J. M., Renesto, A., Nogueira, G. P., Brito, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, pág.189–96, 2007.

Clarke, J. J. GnRH secretion. In: **International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Anais. v. 5, Dublin, pág.1-9, 1988.

Cavalieri, J., Rubio, I., Kinder, J. E., Entwistle, K. W., Fitzpatrick, L. A. Synchronization of estrus and ovulation and associated changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, pág. 801-814, 1997.

Colazo, M. G.; Kastelic, J. P.; Mapletoft, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, pág. 855-865, 2003.

Combarnous, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 4, pág. 670-691, 1992.

Davis, T. L.; Mussard, M. L.; Jimenez-Severiano, H.; Enright, W. J.; Kinder, J. E. Chronic treatment with an agonist of gonadotropin-releasing hormone enhances luteal function in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, pág. 398–403 2003.

D’Occhio, M. J.; Jillella, d.; Lindsey, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, v. 51, pág. 9-35, 1999

D’Occhio, M. J.; Fordyce, G.; Whyte, T. R.; Aspden, W. J.; Trigg, T. E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science** v. 60, pág. 433–442, 2000.

Edmondson, A. J.; Lean, I. J.; Weaver, L. D. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.72, pág. 68-78, 1989.

Ereno, R. L. *Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular*. pág. 65, 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Figueiredo, R. A., Barros, C. M., Pinheiro, O. L., Soler, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v.47, pág.1489- 1505, 1997.

Fike, K. E., Day, M. L., Inskip, E. K., Kinder, J. E., Lewis, P. E., Short, R. E., Hafs, H. D. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v.75, pág.2009-2015, 1997.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C., Turzillo, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, pág.648-654, 2001.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., Yang, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, pág.109-126, 2004.

Galina, C. S.; Orihuela, A.; Rubio, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 465–470, 1996.

Gimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Carvalho, N. A. T., Torres-Junior, J. R. S., Souza, A. H., Madureira, E. H., Trinca, L. A., Sartorelli, E. S., Barros, C. M., Carvalho, J. B. P., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, pág.852-858, 2008.

Ginther, O. J., Kastelic, J. P., Knopf, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, pág.187-200, 1989.

Ginther O. J., Wiltbank M. C., Fricke P. M., Gibbons J. R., Kot, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, pág.1187–94, 1996.

Ginther, O. J., Kot, K., Wiltbank, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**. v.48, pág.75-87, 1997.

Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfeld, D. R., Donadeu, F. X., Kot, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, pág.638–647, 2001a.

Ginther, O. J., Bergfeld, D. R., Beg, M. A., Kot, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameters ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, v.65, pág.345-350, 2001b.

- Gong, J. G., Wilmut, I., Bramley, T. A., Webb, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v.45, pág. 611-622, 1996.
- Gordon, I. Controlled breeding in cattle. **Animal Breeding Abstracts**, v.44, n.6, pág.265- 275, 1976.
- Hafez, E. S. E. Anatomy of female reproduction. In: **Reproduction in Farm Animal**. Philadelphia: Lea & Febiger; pág. 23, 1993.
- Hansel, W., Convey, E. M. Physiology of the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.57, pág. 404-424, 1983. Supplementum 2.
- Hurnik, J. F. Sexual behavior of female domestic mammals. **Veterinary Clinics of North America**.: Food Animal Practice., v.3, pág. 423-61, 1987.
- Ireland, J. J. Evidence for autocrine and paracrine roles of  $\alpha$ 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulose cells and development of dominant follicles. **Endocrinology**, v.145, pág. 2784-2794, 2004.
- Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, pág .1269–1278, 1990.
- Kastelic, J. P; Mapletoft, R. J. Follicular responses in dairy cows treated with GnRH and Cloprostenol. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, pág. 107-109, 1998.
- Kulick, L. J., Kot, K., Wiltbank, M. C., Ginther, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v.52, pág. 913–921, 1999.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., Thatcher, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, pág. 3615-3626, 1992.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A., Adams, G. P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, pág. 24-51, 2000. Suplemento. Apresentado à XV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões.
- Macmillan, K. L; Peterson, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v.33, pág. 1-25, 1993.
- Martinez, M. F.; Kastelic, J. P.; Bó, G. A.; Caccia, M.; Mapletoft, R. J. Effects of oestradiol and some of this esters on gonadotrophin releasing and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, pág. 37–52, 2005.

Marques, M. O., Sá Filho, M. F., Gimenes, L. U., Figueiredo, T.B., Sória, G.F., Baruselli, P.S. Efeito do tratamento com PGF2 $\alpha$  na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção á inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Veterinary Science**, v.33, (suplemento 1), pág. 287 (abstract), 2005.

Milvae, R. A., Hinckley, S. T., Carlson, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, pág. 1327-1349, 1996.

Murphy, B. D., Martinuk, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, n.1, pág. 27-44, 1991.

Murphy, M. G., Boland, M. P., Roche, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction Fertility**, v.90, pág. 523-33, 1990.

Nogueira, M. F. G, Buratini, Jr. J., Price, A. C. S., Castilho, M. G. L., Barros, C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, pág. 680-686, 2007.

Odde, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, pág. 817-830, 1990.

Padula, A. M.; Borman, J. M.; Wright, P. J.; Macmillan, K. L. Temporary suppression of pulsatile LH release following a single injection of a GnRH agonist (deslorelin) in ovariectomised Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 70, pág. 37-47, 2002.

Padula, A. M.; . Macmillan, K. L. Observations on the reproductive effects of once or twice weekly injections for 6 weeks of the GnRH agonist deslorelin in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 85, pág. 223–230, 2005.

Pentado, L.; Sá Filho, M. F.; Martins, C. M.; Gimenes, L. U.; Ayres, H.; Baruselli, P. S. Variação na taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, pág. 260, 2005.

Pursley, J. R., Mee, M. O., Wiltbank, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v.44, pág. 915-923, 1995.

Rajamahendran, R.; Ambrose, J. D.; Schmitt, E. J.; Thatcher, M. J.; Thatcher, W. W. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 50, pág. 1141–1155, 1998.

Roberson, M. S., Wolfe, M. W., Stumpf, T. T., Kittok, R. J., Kinder, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v.41, pág. 997-1003, 1989.



Sangsritavong, S.; Combs, D. K.; Sartori, R.; Armentano, L. E.; Wiltbank, M. C.; High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 85, pág. 2831-2842, 2002.

Santos, J. E. P.; Bartolome, J. A.; Cerri, R. L. A.; Juchem, S. O.; Hernandez, O.; Trigg, T.; Thatcher, W. W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, pág. 421-435, 2004.

Sartorelli, E. S., Carvalho, L. M., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J., Barros, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, pág 2382-2394, 2005.

Savio, J. D., Boland, M. P., Hynes, N., Mattiacci, M. R., Roche, J. F. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7. **Theriogenology**, v. 33, pág. 677, 1990.

Schams, S., Menzer, C. H., Schallenberger, E., Hoffman, B., Haha, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: **Control of Reproduction the Cow**. Commission of the European Communities, Luxembourg, pág. 25-80, 1978.

Silveira, R. L. Regulação de receptores esteróides, dinâmica folicular e incremento na eficácia reprodutiva pós-parto das vacas de corte.. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

Stumpf, T. T., Day, M. L., Stotts, J. A., Wolfe, M. W., Pennel, P. L., Kittok, R. L., Kinder, J. E. Effect of oestradiol on luteinizing hormone secretion during the follicular phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.41, pág. 91-99, 1989.

Thatcher, W. W.; Drost, M.; Savio, J. D.; Macmillan, K. L.; Entwistle, K. W.; Schmitt, E. J.; De la Sota, R. L.; Morris, G. R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, pág. 27-49, 1993.

Thatcher, W. W.; Guzeloglu, A.; Meikle, A.; Kamimura, S.; Bilby, T.; Kowalski, A. A.; Badinga, L.; Pershing, R.; Bartolome, J.; Santos, J. E. P. Regulation of embryo survival in cattle. **Reproduction** (Suppl. 61), pág. 253-266, 2002.

Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., Dufour, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, v.73, pág. 3141-3151, 1995.

Vasconcelos, J. L. M.; Avaliação da sincronização de ovulação e fatores relacionados com a produção de leite e taxa de concepção em vacas. Jaboticabal, SP: UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 1998, **Dissertação** (Doutorado).

Wiltbank, M.C., Gumen, A., Sartori, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, pág. 21-52, 2002.

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