

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”,
CAMPUS DE BOTUCATU**

**NOVAS ABORDAGENS NAS
TÉCNICAS DE SUPEROVULAÇÃO
E CONTROLE DO CICLO ESTRAL
DE RECEPTORAS, NA ESPÉCIE
BOVINA**

Monografia apresentada à Disciplina “Seminários II” do programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, curso de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Aluno : Marcelo F. G. Nogueira

Docentes responsáveis :

Prof^a Dr^a Maria Denise Lopes e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Orientador : Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Botucatu – São Paulo

2 0 0 2

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 SUPEROVULAÇÃO.....	6
2.1 Sincronização da onda folicular e atraso do pico pré-ovulatório de LH.....	6
2.2 Restauração dos pulsos de LH no período pré-ovulatório.....	8
2.3 Aumento da viabilidade do oócito e do embrião.....	9
3 INOVULAÇÃO.....	11
3.1 Utilização do bST em receptoras.....	11
3.2 Aumento da concentração plasmática de progesterona	
a) Indução de corpo lúteo acessório e inserção de dispositivo CIDR-B.....	12
b) Indução de múltiplas ovulações.....	13
3.3 Inibição da luteólise.....	15
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
Anexo.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE = Antiinflamatório não esteróide
b = Espécie bovina
BE = Benzoato de estradiol
CE = Ciclo estral
CIDR-B = Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga, para a espécie bovina
CL = Corpo lúteo
COX-2 = enzima ciclooxigenase 2
e = Espécie eqüina
E₂ = Estradiol 17 β
eCG = Gonadotrofina coriônica eqüina
FD = Folículo dominante
FM = Flunixin meglumine
FSH = Hormônio folículo estimulante
h = Espécie humana
hCG = Gonadotrofina coriônica humana
hMG = Gonadotrofina da menopausa humana
IA = Inseminação artificial
LH = Hormônio luteinizante
o = Espécie ovina
p = Espécie porcina
P₄ = Progesterona
PGF₂ α = Prostaglandina F 2 α
PRID = Dispositivo intravaginal liberador de progesterona
bST = Somatotrofina bovina
SO = Superovulação ou superovulatório (a)
TE = Transferência de embrião
US = Ultra-som ou ultra-sonografia
VE = Valerato de estradiol

INTRODUÇÃO

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular em bovinos, tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a melhorar os protocolos superovulatórios empregados na transferência de embriões. Do mesmo modo, o controle da ocorrência do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) permitiu que estratégias de “atraso” da ovulação fossem desenvolvidas. Com isso, surgiram protocolos de superovulação (SO) que dispensaram a observação do cio (estro comportamental) da doadora de embriões, tanto antes como após o tratamento hormonal. Desse modo, ainda que não ocorresse um aumento no número de embriões viáveis produzidos por colheita, houve um avanço considerável na simplificação do protocolo de SO em bovinos.

Além de dispensar uma incumbência diferenciada por parte dos funcionários de uma propriedade rural (a correta observação de cio das doadoras, inclusive durante o período noturno), esses protocolos propiciam o planejamento das inseminações artificiais (IA) de acordo com o momento da indução exógena da ovulação.

Porém, a grande variação na resposta superovulatória ainda constitui um obstáculo para uma maior utilização da SO em bovinos. Ainda que fatores intrínsecos dessa variação (fator individual das doadoras) sejam de difícil solução, alguns outros fatores poderiam ser otimizados na tentativa de aumentar a produção de embriões, tais como; atraso do pico pré-ovulatório de LH para aumentar a população de folículos pré-ovulatórios; geração exógena de pulsos de LH para repor a diminuição que ocorre após a SO; a utilização de somatotrofina recombinante bovina (rbST) de forma pós-tuma à SO, para aumentar a competência dos oócitos oriundos de folículos marginais ao diâmetro ovulatório mínimo; e associações de dois ou mais dos itens citados acima.

Por outro lado, a técnica da inovulação em bovinos (isto é, o ato de depositar o embrião no corno uterino, normalmente *ipsilateral* ao corpo lúteo; CL) sofreu poucas mudanças nos últimos anos, sendo que a maior delas ocorreu há mais de 10 anos na transição da forma cirúrgica de inovulação para a atual não cirúrgica (de utilização corrente).

Recentemente, os trabalhos com receptoras de embriões vêm enfocando a busca pelo aumento da taxa de concepção/prenhez por meio do aumento da

progesterona (com a utilização de GnRH, LH, hCG, eCG e CIDR-B), mediante a inibição da luteólise (antiinflamatórios não esteróides, ácido linolêico) ou por um aumento na produção de interferon τ bovino (rbST). Concomitante a isto, os pesquisadores buscam protocolos de sincronização da ovulação que permitam a inovulação em tempo fixo (isto é, sem prévia observação do cio da receptora a ser inovulada), com o intuito de maximizar a utilização do rebanho de receptoras e diminuir os custos de manutenção do mesmo.

O presente trabalho de revisão tem por objetivo discutir as possíveis aplicações, no campo, das novas abordagens dos protocolos de superovulação e inovulação em bovinos, enfatizando o potencial para o aumento dos índices produtivos.

SUPEROVULAÇÃO

Sincronização da onda folicular e atraso do pico pré-ovulatório de LH

Embora os conhecimentos obtidos com a dinâmica folicular (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989) tenham ajudado a compreender alguns eventos que ocorrem na superovulação de bovinos e propiciaram novas ferramentas para facilitar o manejo da doadora (Bo et al., 1996; Caccia et al., 1999), a resposta superovulatória (isto é, o número de embriões viáveis colhidos) continua a apresentar resultados imprevisíveis. Em parte, esse fenômeno foi explicado pela assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas sob um tratamento de SO (assincronia intrafolicular) no período pré-ovulatório, assim como deficiências no transporte espermático (Hyttel et al., 1986, 1991).

Por outro lado, resultados inconstantes na SO foram associados com ovulações prematuras ocorrendo durante o tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH), com a conseqüente formação precoce de um corpo lúteo secretando níveis sub-luteais de progesterona no período esperado do estro e, por fim, inibição do pico pré-ovulatório de LH e ausência de ovulações (Callesen et al., 1987; Stock et al., 1996). Além disso, uma assincronia interfolicular foi observada nos animais sob tratamento SO (Vos et al., 1994^a). Nesses animais, da população de folículos que foi estimulada pelo FSH exógeno, somente 25% estavam aptos a continuar o desenvolvimento até a ovulação no momento da ocorrência do pico de LH. Esse fato foi explicado pelos diferentes diâmetros existentes no grupo de folículos em crescimento, fazendo com que alguns poucos folículos avançados (os maiores do grupo) induzissem o pico de LH quando ainda nem todos eles (notadamente os folículos menores) estavam com a capacidade ovulatória totalmente instalada.

A partir desses conceitos, foi aventada a possibilidade de atrasar o pico endógeno pré-ovulatório de LH para propiciar o tempo necessário para que os folículos menores, recrutados mediante a aplicação exógena de FSH, pudessem estar plenamente maduros e aptos a ovular quando o pico de LH fosse induzido (Rieger et al., 1990; Vos et al., 1994^b; D'Occhio et al., 1997; Price et al., 1999; van de Leemput et al., 2001).

Resultados promissores foram obtidos, e posteriormente modificados, com o atraso do pico endógeno de LH por, aproximadamente, 4 a 8 horas mediante a retirada do dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (CIDR-B) após 48 (Nogueira et al., 2002^a) ou 36 horas da aplicação da PGF2 α (Barros & Nogueira, 2001) concomitante com a indução da ovulação por meio da administração de LH exógeno (Lutropin, 25 mg, im) 48 horas após a aplicação da prostaglandina (PGF2 α ; Figura 1). Esse protocolo propiciou o início do tratamento superovulatório, em vacas Nelore, sem prévia observação de cio (uma vez que foi induzida a emergência de uma nova onda de crescimento folicular no momento do início da aplicação do FSH), além de não haver necessidade da observação de cio para a IA (as doadoras foram inseminadas em tempo fixo, após 12 e 24 horas da administração do LH). O benefício obtido com esse protocolo (P48) na simplificação do manejo das doadoras, não comprometeu a produção de embriões viáveis quando comparada ao grupo controle ($7,17 \pm 1,08$ e $6,17 \pm 1,37$, respectivamente).

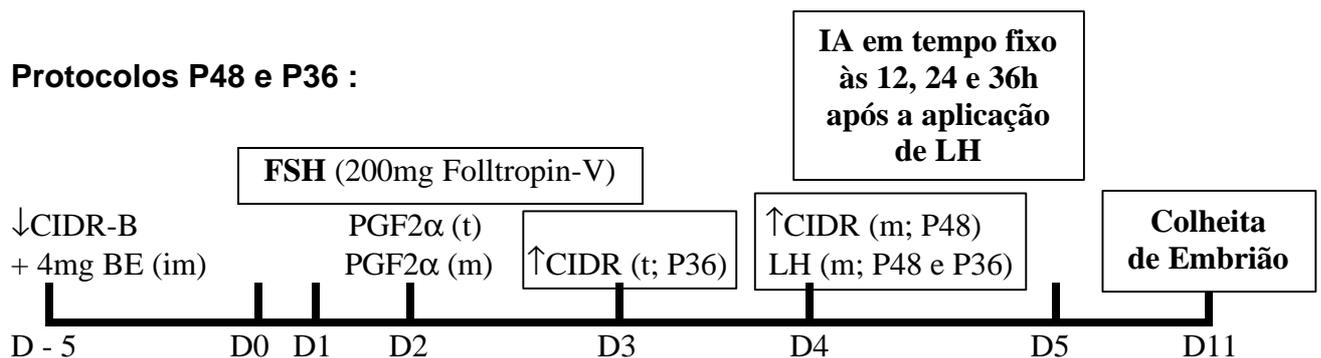


Figura 1 – Protocolos utilizados para sincronizar a emergência da onda de crescimento folicular, induzir a ovulação de forma controlada e permitir a IA em tempo fixo. A diferença entre os protocolos P36 e P48 é o momento da retirada do CIDR-B, que acontece com 12 horas de diferença (36 e 48 horas após a administração da primeira dose de prostaglandina, respectivamente), sendo que o momento de aplicação do LH permanece o mesmo para ambos os protocolos (48 horas após a aplicação de prostaglandina). A emergência de uma nova onda de crescimento folicular foi induzida, em momento aleatório do ciclo estral, cinco dias antes do início do tratamento com FSH. Duas doses luteolíticas de prostaglandina foram utilizadas na manhã e tarde do Dia 2 (ou seja, no segundo dia após o início do tratamento com FSH).

Em uma modificação do P48, denominada P36 (Barros & Nogueira, 2001), o dispositivo CIDR-B foi removido 12 horas antes que no protocolo original (isto é, 36 horas após a PGF2 α), após 12 horas da remoção do CIDR-B foi administrado o LH e as IAs foram realizadas em tempo fixo após 12, 24 e, eventualmente, 36 horas. Apesar

de serem resultados iniciais (20 colheitas realizadas, vide Anexo A) e necessitarem de um número expandido de animais, utilizando o protocolo P36, em vacas Nelore, foram obtidas as médias de 13,4 e de 10,6 estruturas totais e embriões viáveis, respectivamente, com uma taxa de viabilidade de 78,7% (211/268; 3,3 doses de sêmen utilizadas por colheita; Nogueira, 2002*).

Restauração dos pulsos de LH no período pré-ovulatório

Conforme demonstrado por PRICE et al. (1999) e GOSSELIN et al. (2000), durante o tratamento superovulatório ocorre uma diminuição dos pulsos de LH, quando comparado à pulsatilidade fisiológica de um ciclo estral normal. Essa diminuição tem início logo após a primeira aplicação de FSH e acentua-se ao redor das últimas aplicações e do período pré-ovulatório (Price et al., 1999). É sabido que o folículo muda a sua dependência por gonadotrofinas (de FSH para, principalmente, o LH) quando atinge, aproximadamente, 9 mm de diâmetro (Ginther et al., 1996; 2001). Em animais não superovulados, o crescimento folicular da fase pós-desvio (9 mm) até o momento da ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, é mantido pela crescente pulsatilidade do LH. Foi aventada a hipótese que, durante a SO, a diminuição dos pulsos de LH em um período crítico do crescimento folicular (fase pré-ovulatória) poderia estar comprometendo a plena maturação da população de folículos presentes.

Devido ao fato da administração exógena de FSH na SO (um extrato de pituitária suína contendo FSH e, embora reduzido em 80% da concentração original do extrato, também LH) não ser capaz de transpor a deficiência endógena na pulsatilidade de LH, PRICE et al. (1999) propuseram repor o padrão fisiológico dos pulsos de LH mediante administrações de GnRH (Cystorelina, 5 µg, iv, a cada 4 horas diminuindo o intervalo até uma aplicação por hora) e, ao mesmo tempo, aumentar a fase folicular induzida com a utilização de dispositivo de progesterona (CIDR-B).

Embora não tenham ocorrido quaisquer ovulações no grupo com induções de pulsos de LH (CIDR+GnRH), quando comparado ao grupo controle (sem GnRH ou

* Nogueira, M.F.G. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu). Comunicação pessoal, 2002.

CIDR) e o grupo onde somente o CIDR foi utilizado ($13,8\pm 2,0$ e $9,4\pm 2,0$, respectivamente), houve um aumento não significativo no número de folículos visíveis por ultra-sonografia no período pré-ovulatório com relação ao grupo CIDR, mas não quando comparado ao grupo controle (18 ± 4 , 13 ± 4 e 18 ± 4 , respectivamente). Também foi observado um aumento significativo na concentração plasmática de estradiol no grupo CIDR+GnRH quando comparado ao grupo CIDR, porém não com o grupo controle (26 ± 1 , 2 ± 2 e 20 ± 3 pg/mL, respectivamente).

Os autores (Price et al., 1999) demonstraram que, com a utilização do CIDR para aumentar a fase folicular induzida pela SO, houve um efeito prejudicial sobre os folículos (concentração de estradiol, número de folículos e taxa de ovulação reduzidas), quando comparado ao grupo controle onde a SO foi realizada sem a presença do CIDR. Quando os pulsos de GnRH foram restaurados (grupo CIDR+GnRH) o efeito prejudicial não foi observado e os resultados obtidos foram semelhantes aos do grupo controle, com exceção na falha na ovulação observada no grupo CIDR+GnRH. A explicação aventada pelos autores é de que, embora os pulsos de LH gerados tenham sido benéficos para o crescimento final dos folículos na fase folicular aumentada, o excesso de induções de pulsos (1 pulso por hora, no dia da provável ocorrência do pico pré-ovulatório de LH) levou a uma dessensibilização da hipófise anterior frente ao GnRH. Assim, quando foi administrada a dose de GnRH ($100\mu\text{g}$, im) visando induzir um pico de LH, não houve a liberação do mesmo devido a adeno-hipófise estar refratária ao GnRH.

Talvez, a idéia do atraso do pico pré-ovulatório de LH possa ser efetivamente implementada com a associação entre aumento da fase folicular e a restauração dos pulsos de LH nesse mesmo período. Isso poderia esclarecer se as tentativas em atrasar o pico de LH por 24 horas falharam, em aumentar a produção de embriões, por excesso de atraso do pico (indução da atresia folicular por envelhecimento) ou pela falta de pulsatilidade de LH (indução da atresia por privação de gonadotrofina).

Aumento da viabilidade do oócito e do embrião

Uma possibilidade para incrementar a técnica de SO é o aumento da porcentagem de embriões viáveis com relação ao número total de estruturas colhidas (taxa de viabilidade).

Uma das tentativas realizadas, nesse sentido, foi a utilização do bST nas doadoras de embriões, após a SO propriamente dita. O bST (somatotrofina bovina) quando administrado a doadora, induz a síntese do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I) no fígado, aumentando de forma sistêmica os níveis desse fator de crescimento, e também de forma localizada no próprio ovário.

Além da ação mitogênica e do sinergismo com o estradiol 17β na aparição de receptores de LH nas células da granulosa (ação no crescimento folicular), o IGF-I está diretamente ligado à maturação oocitária, uma vez que existem receptores de IGF-I, e da própria bST, nos oócitos bovinos (Izadyar et al., 1997). Assim, tanto uma ação direta da aplicação do bST poderia ser esperada na maturação oocitária, como uma ação indireta também (IGF-I).

A idéia de que haveria um efeito benéfico, pela administração de bST, nos embriões produzidos de doadoras superovuladas foi testada por MOREIRA et al. (2002) em vacas Holandesas lactantes (n=8) e não lactantes (n=4). Após o tratamento superestimulatório com FSH, foi administrado bST (500 mg, sc) em uma única aplicação no momento da IA. Os embriões foram colhidos 7 dias após a IA, e criopreservados em etileno glicol. Os embriões foram descongelados (método direto – “direct transfer”) e inovulados em receptoras (grupo bST, n=41; grupo controle, n=43). O uso de bST aumentou significativamente, quando comparada ao grupo controle, a taxa de viabilidade dos embriões colhidos (77,2% e 56,4%, respectivamente; $P < 0,01$), o número de blastocistos por colheita ($2,4 \pm 0,7$ e $0,4 \pm 0,7$, respectivamente; $P < 0,04$) e a taxa de prenhez (56,1% e 25,6%, respectivamente; $P < 0,04$).

Embora o uso do bST tenha apresentado um efeito benéfico nesse estudo, quando comparado ao grupo que não recebeu a somatotrofina, os resultados devem ser analisados com cuidado. A maior velocidade de crescimento dos embriões, após o uso do bST (maior número de blastocistos por colheita, porém sem alterar a qualidade geral dos embriões) não seria, por si só, um critério de melhora da resposta superovulatória. O aumento observado nas taxas de viabilidade e de prenhez constituíram, nesse estudo, uma melhoria efetiva com relação ao grupo não tratado. Porém, deve-se ter em conta que a maioria das doadoras utilizadas (8 de 12 animais) eram holandesas lactantes, assim como todas as receptoras. Dessa forma, animais particularmente sensíveis ao estresse térmico (o estudo foi realizado em Gainesville, Flórida - EUA) poderiam estar em condições fisiológicas inadequadas quando as SOs e as inovulações foram realizadas. Nesse cenário, qualquer auxílio ao

desenvolvimento embrionário poderia resultar em um aumento significativo da taxa de prenhez, o que de fato ocorreu, sem necessariamente refletir uma realidade para outras raças de animais em climas diversos (p.ex., gado Nelore em condições climáticas subtropicais). Isso fica mais evidente quando verificamos que a taxa de prenhez do grupo não tratado (controle), ficou abaixo do obtido em animais não estressados (aproximadamente 45% de gestação, após transferência direta). Assim, o efeito benéfico do uso de bST na SO de outras raças bovinas, deveria ser analisado com cautela, talvez, manifestando-se somente em situações onde haja o estresse dos animais.

INOVULAÇÃO

Utilização do bST em receptoras

Do mesmo modo que citado anteriormente em doadoras, o uso do bST em receptoras foi testado com o intuito de melhorar a taxa de prenhez (Moreira et al., 2002). Apesar do mecanismo não estar esclarecido, a utilização do bST estaria estimulando as condições uterinas/embrionárias necessárias para um eficiente estabelecimento da gestação (secreção endometrial, formação do CL e conseqüente secreção de progesterona, e estímulo direto do embrião e conseqüente secreção de interferon τ).

Receptoras holandesas lactantes, receberam bST um dia após o estro (Posilac, 500 mg, sc) e foram tratadas novamente a cada 14 dias (grupo bST, n=37) ou não receberam tratamento com bST (grupo controle, n=43). Após a inovulação de embriões descongelados (criopreservados em etileno glicol), a taxa de prenhez foi de 43,2% e 25,6%, respectivamente para os grupos bST e controle. Novamente, o aumento observado no grupo tratado poderia estar refletindo as condições inadequadas do grupo controle (estresse térmico de vacas holandesas lactantes em clima subtropical). Além disso, cabe ressaltar o pequeno número de animais utilizados nesse estudo, o que poderia estar comprometendo uma correta compreensão dos resultados obtidos.

Aumento da concentração plasmática de progesterona

a) Indução de corpo lúteo acessório e inserção de dispositivo CIDR-B

Está bem estabelecida a relação entre a concentração plasmática de progesterona, o tamanho do embrião bovino e a secreção de interferon τ por parte do embrião (Wilmut et al., 1985; Robinson et al., 1989; Binelli et al., 2001; Thatcher et al., 2001). Desse modo, estudos vem sendo conduzidos com o intuito de desenvolver protocolos eficazes (em aumentar a progesterona e a taxa de concepção) e viáveis na aplicação em propriedades comerciais.

Trabalhos subseqüentes estudaram a ação da aplicação de hCG no 5º dia do ciclo estral (CE), de GnRH no 13º dia do CE e mesmo a inserção de dispositivos liberadores de progesterona (CIDR-B e PRID) ou de implantes de progestágeno (Crestar e SynchroMate-B). Embora em alguns estudos tenha sido observado um aumento na taxa de concepção (após IA ou TE), em outros não foram detectados efeitos benéficos. Assim, essa área de pesquisa permaneceu sem consenso quanto a uma real aplicação comercial dos diversos protocolos idealizados.

Marques et al. (2002) visaram a formação de um CL acessório (como auxiliar ao CL original na secreção de progesterona) mediante a ovulação induzida do folículo dominante da 1ª onda folicular. Esse CL acessório era obtido pela administração de indutores da ovulação (GnRH, hCG e LH) no 7º dia do CE, ou seja, no dia em que as receptoras são, normalmente, inovuladas. Além disso, foi testada a inserção de um dispositivo de progesterona (CIDR-B) no mesmo dia 7 do CE, permanecendo por 13 dias nos animais. Com isso, os autores esperavam obter incrementos detectáveis na concentração plasmática de progesterona o que, posteriormente em uma segunda fase do estudo, seria correlacionado com a taxa de concepção após inovulação.

Os tratamentos (GnRH, LH e hCG) foram efetivos em induzir a ovulação de 100% dos FD da primeira onda, presentes no momento da aplicação. A concentração plasmática de progesterona, entre os dias 13 e 17 do CE, foi significativamente maior no grupo hCG quando comparada aos grupos LH, GnRH, CIDR-B e controle ($8,42 \pm 3,64$; $6,07 \pm 3,09$; $4,79 \pm 2,19$; $4,78 \pm 1,88$ e $4,83 \pm 1,77$ ng/mL, respectivamente). O tratamento com hCG também aumentou a duração do período lúteo ($P_4 > 1$ ng/ml) quando comparado aos grupos LH, GnRH e controle.

Assim, seria de esperar que o tratamento com hCG no dia da inovulação de embriões (7º dia do CE) pudesse aumentar a taxa de concepção das receptoras.

Porém, foi relatado que, em resultados preliminares, a taxa de concepção aumentou em todos os grupos tratados (hCG, LH, GnRH e CIDR-B) quando comparados ao grupo controle (Marques, 2002*).

b) Indução de múltiplas ovulações

Uma outra abordagem para aumentar a concentração de progesterona é a indução de mais de uma ovulação no ciclo estral precedente à inovulação e, assim, propiciar a formação de múltiplos CLs. Uma diferença que existe nesta abordagem e naquelas descritas no item anterior (item a) é o período em que poderá ocorrer o aumento da progesterona. Enquanto na primeira (item b) o aumento poderia ser verificado logo nos primeiros 3 ou 4 dias do CE, na última estaria ocorrendo após o 8º ou 9º dia do CE.

Baruselli et al. (2001) utilizaram dispositivos de CIDR-B associados ao BE e a progesterona para induzir a emergência de uma nova onda folicular (D0). Uma dose de prostaglandina foi administrada no Dia 7 (manhã) e 12 horas após o CIDR-B foi removido. Na manhã do Dia 8 foi administrado BE (0,5 mg) e o Dia 9 foi considerado como sendo o dia do cio (grupo controle, n=50). As receptoras do grupo tratado com gonadotrofina coriônica equina (eCG; n=50) receberam o mesmo tratamento descrito acima com a exceção da aplicação de eCG (800 UI, Novormon, im) na manhã do Dia 5, ou seja, no momento previsto da emergência de uma nova onda folicular. No Dia 15 todas as receptoras foram examinadas por ultra-sonografia, para a contagem de CLs, e amostras de plasma foram coletadas para a detecção das concentrações de progesterona. No Dia 16, somente aquelas receptoras com múltiplos CLs ou um único CL $\geq 1,3 \text{ cm}^2$ receberam embriões congelados/descongelados (1,5M de etileno glicol) pelo método direto.

A concentração de progesterona ($1,9 \pm 0,7$ e $0,4 \pm 0,1$ ng/ml) e a taxa de concepção (21/38, 55,3% e 5/17, 29,4%) aumentaram no grupo eCG, quando comparadas ao grupo controle, respectivamente.

Entretanto, além da análise de progesterona estar com os resultados alterados (como pode ser observado na baixa concentração encontrada no grupo controle,

* Marques, M.O. (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP – São Paulo). Comunicação pessoal, 2002.

similar aos que ocorrem normalmente na fase folicular e não lútea), a taxa de concepção do grupo controle está aquém do esperado (29,4%), resultando, talvez, na incorreta interpretação de um aumento real da concepção com a utilização do eCG.

Por outro lado, um fator positivo nesse estudo foi a inovulação de receptoras em tempo fixo (sem observação prévia do cio), ainda que às expensas de uma intensa administração de hormônios e manejo dos animais. Com isto, o aproveitamento das receptoras selecionadas para a inovulação e, conseqüentemente a taxa de prenhez, aumentaram com relação ao grupo controle.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, BÓ et al. (2002) utilizaram um protocolo semelhante ao descrito acima, porém diminuíram a dose de eCG utilizada (400 UI; n=156) nas receptoras. Com isso, o número de receptoras com múltiplas ovulações diminuiu (3/156, 2% das vacas tinham dois CLs), porém o diâmetro do CL ($18,5 \pm 0,4$ e $17,7 \pm 0,4$) e a taxa de concepção aumentaram (57,6% e 41,7%), quando comparados com o grupo não tratado (n=156), respectivamente.

Cabe ressaltar que a taxa de concepção obtida no grupo controle está condizente com aqueles obtidos em programas comerciais utilizando embriões criopreservados em etileno glicol. Talvez esse resultado tenda a ficar abaixo do esperado (45-50%) pelo fato do diagnóstico ter sido realizado aos 30 dias de idade gestacional e, assim, poderiam estar ocorrendo perdas embrionárias/fetais até um segundo diagnóstico ser realizado aos 60 dias de gestação. Mais uma vez, esse protocolo modificado mostrou ser eficaz para a inovulação em tempo fixo.

Ainda dentro dessa linha de trabalho, NOGUEIRA et al. (2002^b) utilizaram um protocolo em que o eCG foi administrado entre os Dias 7 e 12 do CE, ou seja, não houve uma sincronização entre a emergência da onda folicular e a administração do eCG em diferentes doses (200, 400 e 600 UI, im).

Os resultados observados nos grupos com as maiores doses de eCG (400 e 600 UI) foram inesperados e, aparentemente, contraditórios. Assim, enquanto houve um aumento na concentração plasmática de progesterona, relacionado com a dose de eCG administrado, de forma simultânea houve uma diminuição na taxa de concepção observada aos 28 e 90 dias de gestação (ver Tabela 1).

Os autores aventaram a hipótese de que as maiores doses de eCG (400 e 600 UI) poderiam estar luteinizando as células da granulosa de FDs presentes no momento da aplicação, associada a uma múltipla ovulação (15,3% e 37,5% das receptoras nos

Tabela 1. Características observadas nos grupos controle (sem eCG), 200, 400 e 600 UI de eCG, quando administrado entre os Dias 7 e 12 do ciclo estral.

Características	Grupos (n=83)			
	Controle	200	400	600
Cio observado (%)	74 (89,2) ^a	61 (73,5) ^b	75 (90,4) ^a	75 (90,4) ^a
Novilhas selecionadas (%)	43 (58,1)	32 (52,5)	44 (58,7)	43 (57,3)
Concentração P ₄ (ng/ml)	3,68±0,72 ^a	4,25±0,48 ^a	6,03±0,53 ^{a,b}	7,78±0,71 ^b
Taxa de concepção D28 (%)	19 (44,2) ^a	17 (53,1) ^a	11 (25,0) ^b	11 (25,6) ^b
Taxa de concepção D90 (%)	18 (41,9) ^a	16 (50,0) ^a	11 (25,0) ^b	9 (20,9) ^b

^{a,b} Letras diferentes, na mesma linha, indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$; Qui-quadrado, ANOVA e teste exato de Fisher).

grupos 400 e 600, respectivamente). Com isso, as concentrações de progesterona poderiam estar elevadas (> 2 ng/ml) entre o 3^o e o 5^o dia do CE, levando a uma liberação precoce de prostaglandina e, conseqüentemente, uma luteólise e perda do concepto.

De forma geral, parece haver a necessidade de sincronizar a emergência de uma onda folicular, para que a aplicação de eCG coincida com a presença de uma população de folículos pequenos ($\cong 3$ a 4 mm de diâmetro), conforme preconizado por BÓ et al. (2002), sendo que a administração de doses de eCG maiores ou iguais a 400 UI, em momento aleatório entre o 7^o e o 12^o dia do CE (Nogueira et al., 2002^b), resultou em uma drástica diminuição da taxa de concepção.

Inibição da luteólise

A luteólise em bovinos está relacionada diretamente com a síntese de PGF₂ α e esta, por sua vez, com a expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2). Algumas tentativas para incrementar as taxas de prenhez estão sendo dirigidas para a administração oral de dieta rica em ácido linolêico. Esse ácido possui a propriedade de inibir a síntese da prostaglandina endometrial via inibição da atividade da COX-2 (revisto por Binelli et al., 2001).

Outra possibilidade seria a administração de outros ácidos graxos (ácidos eicosapentaenóicos; EPA) que estariam competindo, como substrato, com o ácido

aracônico pela ação de duas enzimas chaves da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, a PLA_2 e a COX (revisto por Thatcher et al., 2001). Desse modo, a síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ estaria sendo deslocada para a produção de outros compostos menos bioativos e sem evidências na participação da luteólise em bovinos.

Porém, até o momento, nenhum estudo conclusivo foi publicado indicando que a suplementação com ácido linoléico ou com outros ácidos graxos (EPA e DHA) possa aumentar a taxa de concepção de receptoras em boas condições corporais e sob nenhum ou pouco estresse térmico.

Uma outra alternativa para inibir a luteólise seria a administração de antiinflamatórios não esteróides (AINE), como o flunixin meglumine, o diclofenaco e o rofecoxib.

Essa classe de drogas tem a propriedade de inibir a síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ (e de outras prostaglandinas) mediante a supressão da transcrição dos genes das COXs. Enquanto algumas das mais novas drogas comercializadas (p.ex., Rofecoxib) inibem, de forma preferencial a COX-2 (enzima responsável pela síntese induzida de prostaglandinas), outros fármacos atuam de maneira inespecífica na inibição da COX-2 e da COX-1 (enzima responsável pela síntese das prostaglandinas constitutivas).

Em 1998, ODENSVIK et al. já haviam observado o prolongamento no comprimento do ciclo estral de novilhas que receberam flunixin meglumine (2,2 mg/Kg P.V., via oral), porém não foi testada a performance reprodutiva desses animais. Além disso, o tratamento só foi eficaz quando a administração oral foi realizada 4 vezes ao dia, o que torna o protocolo pouco prático.

Mais recentemente (Schrick et al., 2001; McNaughtan et al., 2002), obtiveram resultados contraditórios com a administração de flunixin meglumine (FM; 10 ml, im) previamente à inovulação de embriões bovinos (criopreservados ou não).

Enquanto um aumento na taxa de concepção após a inovulação de embriões não criopreservados foi observado por SCHRICK et al. (2001), nenhum efeito foi detectado com a utilização do FM antes da inovulação de embriões criopreservados (McNaughtan et al., 2002). Entretanto, McNAUGHTAN et al. (2002) observaram que quando a inovulação era realizada o mais cranial possível (no ápice do corno uterino), a utilização do FM foi eficaz em aumentar a taxa de concepção, quando comparada ao grupo não tratado, o mesmo não ocorrendo quando as inovulações eram realizadas na região caudal do corno uterino. Os autores aventaram a hipótese de que quanto mais

cranial a inovulação, maiores lesões no endométrio estariam ocorrendo e liberando, conseqüentemente, maiores concentrações de prostaglandina, quando comparado às inovulações caudais.

Além do possível efeito luteolítico, a prostaglandina liberada em decorrência das lesões provocadas no endométrio, estaria sendo diretamente deletéria para o embrião recém-inovulado (Scenna et al., 2002; diminuição da taxa de eclosão *in vitro*). Assim, uma provável explicação para a inconstância nos resultados publicados, após o uso do FM, poderia ser a relação entre o efeito benéfico do FM somente aparecer após inovulações laboriosas, onde estariam sendo liberadas quantidades significativas de prostaglandina, que acarretaria em uma baixa taxa de eclosão do embrião inovulado associada a uma indução da luteólise.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados dos trabalhos apresentados nesta revisão, conclui-se que :

1) A indução da emergência de uma nova onda de crescimento folicular, associada ao controle do pico endógeno de LH e à administração exógena de LH, permitiu a IA em tempo fixo e dispensou a observação de cio, da doadora, tanto antes como após a superovulação. Esse protocolo (P36) estabeleceu taxas de prenhez comparáveis aos programas convencionais de transferência de embrião com detecção de cio.

2) A utilização de bST, no momento da IA de animais superestimulados, mostrou-se benéfico quando as doadoras estavam sob estresse térmico. Esse tratamento melhorou as taxas de viabilidade e de concepção dos embriões colhidos. Do mesmo modo, a utilização do bST em receptoras sob estresse mostrou um efeito positivo, aumentando a taxa de concepção após a inovulação de embriões criopreservados.

3) A administração de eCG em receptoras, no momento da emergência de uma onda folicular induzida, propiciou um aumento nas taxas de concepção e prenhez, após a inovulação de embriões criopreservados. Além disso, a inovulação pôde ser realizada em tempo fixo, sem a prévia detecção de cio.

4) Não existe consenso se a administração, no momento da inovulação, de flunixin meglumine ou de outros antiinflamatórios não esteróides, aumentaria a taxa de concepção de receptoras. Talvez, um possível aumento seria nitidamente observado após inovulações dificultosas e/ou realizadas na região mais cranial do corno uterino.

5) Quando as receptoras não estão em plenas condições fisiológicas (condições subótimas), talvez uma série de procedimentos possam vir a melhorar os índices reprodutivos. Porém, se esses mesmos procedimentos fossem aplicados em receptoras em boas condições gerais, a provável melhoria tornar-se-ia diluída, nula ou até negativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.

BARUSELLI, P.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R.; BÓ, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. **Theriogenology**, v.55, p.355, 2001.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effects of progestogen plus estradiol-17b treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v.45, p.897-910, 1996.

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

CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; BÓ, G.A. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. **Theriogenology**, v.51, p.403, 1999.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.28, p.155-166, 1987.

D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILELLA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L.J.; WALSH, J.; TRIGG, T.E.; MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v.47, p.601-613, 1997.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 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, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Follicle selection in cattle : Role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197-205, 2001.

GOSELIN, N.; PRICE, C.A.; ROY, R.; CARRIÈRE, P.D. Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow : evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. **Theriogenology**, v.54, p.507-521, 2000.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.645-656, 1986.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.35, p.91-108, 1991.

IZADYAR, F.; VAN TOL, H.T.A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.175-180, 1997.

MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in *Bos taurus* X *Bos indicus* heifers administered different treatments on day 7 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.57, p.548, 2002.

McNAUGHTAN, J.W.; YELLAND, R.J.; LINGARD, S.; ABEL, A.; SILCOX, R.W. The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifers embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.57, p.551, 2002.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, p.1371-1387, 2002.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-1634, 2002a.

NOGUEIRA, M.F.G.; MELO, D.S.; CARVALHO, L.M.; FUCK, E.J.; BARROS, C.M. High levels of progesterone, induced by eCG, decreased conception rates in heifers, after frozen embryo transfer. **Theriogenology**, v.57, p.556, 2002b.

ODENSVIK, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. The effect on luteolysis by intensive oral administration of Flunixin granules in heifers. **Animal Reproduction and Science**, v.50, p.35-44, 1998.

PRICE, C.A.; CARRIÈRE, P.D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H.; GUILBAULT, L.A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.37-46, 1999.

ROBINSON, N.A.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.202-207, 1989.

RIEGER, D.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H.; COY, D.H. The effect of treatment with a LHRH antagonist on the quality of Day-7 embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.33, p.207, 1990.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663-671, 1988.

SCENNA, F.N.; HOCKETT, M.E.; BLACKMON, H.E.; SCHRICK, F.N. Development of *in vivo*-derived bovine embryos cultured with prostaglandin F_{2α}. **Theriogenology**, v.57, p.512, 2002.

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; WERT, N.E.; WEHRMAN, M.E. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.370, 2001.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-317, 1988.

STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v.45, p.1091-1102, 1996.

THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T.R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1450, 2001.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v.55, p.573-592, 2001.

VOS, P.L.A.M.; VAN DER SCHANS, A.; DE WIT, A.A.C.; WILLEMSE, A.H.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Effect of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.387-393, 1994a.

VOS, P.L.A.M.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; DIELEMAN, S.J. Effects of suppression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.43-49, 1994b.

WILMUT, I.; SALES, D.I.; ASHWORTH, C.J. The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. **Theriogenology**, v.23, p.107-119, 1985.

ANEXO A - Relação das colheitas de embrião realizadas nas doadoras tratadas com o protocolo de superovulação **P36**. Nas colunas encontram-se o número de ordem das colheitas (**Nºord**), a identificação da doadora do embrião (**Doadora**), a identificação do touro utilizado no acasalamento (**Touro**), a dose de FSH utilizado na superovulação (**Dose**), o número de palhetas de sêmen utilizadas na IA dessa doadora (**Nº IA**), a data da colheita de embriões (**Data col.**), o número de estruturas totais colhidas (**Eto**), o número de embriões viáveis colhidos (**Evi**), o número de embriões degenerados colhidos (**Deg**), o número de estruturas não fertilizadas/clivadas colhidas (**NF**).

Nºord	Doadora	Touro	Dose	Nº IA	Data col.	Eto	Evi	Deg	NF
1	EE4305	Porche	200mg	4	04/02/02	25	17	3	5
2	DM9424	Bitelo	200mg	4	04/02/02	6	6	0	0
3	CV8033	Ludy	200mg	2	08/02/02	4	2	0	2
4	DN651	Bitelo	200mg	4	15/02/02	13	8	2	3
5	EC8191	Bhajol	200mg	4	15/02/02	31	30	1	0
6	GNA3820	Tandhu	140mg	3	26/02/02	18	0	11	7
7	DM9449	Ludy	200mg	2	26/02/02	6	5	1	0
8	DM9458	Ludy	200mg	2	26/02/02	23	22	1	0
9	EE975	Tandhu	200mg	3	26/02/02	23	18	4	1
10	GNA3763	Bhajol	140mg	4	07/03/02	8	7	0	1
11	EC8183	Tandhu	200mg	3	07/03/02	3	2	0	1
12	EE976	Tandhu	200mg	3	07/03/02	18	17	0	1
13	DM9438	Panagpur	200mg	4	07/03/02	8	8	0	0
14	DM9440	Tandhu	172mg	3	12/03/02	13	12	0	1
15	DN658	Panagpur	200mg	4	12/03/02	10	9	0	1
16	EE4304	Ludy	200mg	2	12/03/02	9	6	1	2
17	EC8198	Ludy	200mg	2	12/03/02	15	9	3	3
18	DM9424	Tatcher	200mg	4	19/03/02	10	10	0	0
19	EC8194	Bhajol	200mg	4	19/03/02	10	10	0	0
20	EE4305	Porche	200mg	5	19/03/02	15	13	1	1