Alexandre Hênryli de Souza

Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Vacas Holandesas de Alta Produção

São Paulo

2008

Alexandre Hênryli de Souza

Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução e Produção Animal

Área de concentração:
Reprodução e Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1955
FMVZ

Souza, Alexandre Hênryli de
Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Vacas Holandesas de Alta Produção / Alexandre Hênryli de Souza. – Pirassununga: A. H. Souza, 2008.
152 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução e Produção Animal.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução e Produção Animal.
Área de concentração: Reprodução e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Vacas holandesas. 2. Estradiol. 3. Progesterona. 4. Escore corporal. 5. Corpo lúteo. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Pagina de rosto	3,4,5	2	Reprodução e Produção Animal	Reprodução Animal
Ficha Catalográfica	4	2	Reprodução e Produção Animal	Reprodução Animal
Folha de avaliação	3	2	Reprodução e Produção Animal	Reprodução Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do ECG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo para vacas holandesas de alta produção", protocolo nº862/2006, utilizando 850 (oitocentos e cinqüenta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research "Effect of eCG and estradiol cypionate in timed artificial insemination protocols in high producing Holstein cows", protocol number 862/2006, utilizing 850 (eight hundred and fifty) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 – 05508-270 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 – fones: (11) 309107676/7671 – e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Souza, Alexandre Hênryli de

Título: Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Este trabalho foi realizado nas seguintes instituições:

- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP, Brasil);
- Dairy Science Department, University of Wisconsin - Madison (WI, EUA);

Aos meus Pais Antônio e Sueli...

Aos meus irmãos Franks e Camila...

À minha esposa Ana Carolina...

Dedico...

Agradecimentos

"Tenho que agradecer a todos vocês, pois eu definitivamente não poderia ter realizado todo este trabalho sozinho. Meus amigos! contem comigo sempre que necessário"
Agradeço imensamente...

A toda minha família e à minha esposa pelo apoio incondicional, amor, paciência e total confiança no meu trabalho.

Ao meu grande amigo Prof. Pietro Baruselli, pelo companheirismo, confiança e orientação no campo da pesquisa. E, mais importante ainda, pelos seus valiosos conselhos no campo ético-profissional. Suas orientações me fizeram refletir, concordando a maior parte das vezes e discordando eventualmente, mas seus conselhos sempre me fizeram amadurecer.

Ao meu orientador de Mestrado e co-orientador durante o Doutorado, e também grande amigo, Prof. Milo Wiltbank (Universidade de Wisconsin-EUA), por me ensinar a ter paixão pela pesquisa, pelo apoio e confiança também incondicionais. Thanks a lot bud!

Às adoráveis Thais, Harumi, Alice, Dayse, Joana, Shirley, Elza Faquim, Neide e dona Sílvia e, ao Miguel, pela sua competência e pelo auxílio nas declarações, documentos e tarefas necessárias durante este período na FMVZ...quantas vezes eu tive que imprimir coisas na sala da Harumi, "roubar" o grampeador da Thaís, a fita adesiva do Miguel, etc.

Aos grandes amigos Henderson (vulgo Harry Potter por sempre organizar a nossa bagunça aqui no VRA e pela grande ajuda durante os experimentos no Brasil e nos EUA, valeu mesmo Harry!...vale lembrar que o Harry deixou uma vaca comer o papel de anotações de um dia inteiro de serviço de ultra-sonografia nos EUA!!!), Lindsay (Não! Não! Não é ai não!!! Pela enorme ajuda com as coisas da Fapesp, nos experimentos, etc), Dr. DMV MS PhD MBA Claudiney de Melo Martins (considerado por "ele mesmo" como o melhor veterinário do Universo, e por "mim" como um grande e modesto amigo), Torres (vulgo "passalinho"! meu caro amigo, você deveria ser comediante e parar de trabalhar com bovinos!), Manoel (pelas risadas – inconfundível), Nélcio (pense em um cara gente boa!), Márcio Ferraz (convivi pouco com ele, mas ele sempre estava pronto pra ajudar), Carlão e Alessandra Teixeira (pela imensa ajuda nos experimentos realizados na Fazenda Santa Rita - Agrindus que contribuíram com muitos dados para esta tese), Ramon (pela grande ajuda em experimentos em fazendas comerciais), Zé Nélio e Gabriel (pela grande ajuda no final do Doutorado), e muitos outros amigos que me ajudaram durante esta graduação.

Aos bons e velhos amigos Marinho e Sandro (Fazenda Iguaçu – StarMilk – Cascavel, PR) e Jorge Gonzales (Fazenda Campestre – São Pedro, SP) pela total confiança, empreendedorismo, companheirismo nos experimentos de campo, por toda aprendizagem e ajuda em momentos difíceis.

Às muitas fazendas e médicos veterinários da região de Vacaria-RS, Castro e Carambeí-PR, Cascavel-PR, Pirassununga-SP, São Carlos-SP, São Pedro-SP, Campinas-SP, Mogi-Guaçu-SP, Araraquara-SP, Presidente-Prodente-SP, Madison-WI/EUA, que permitiram a utilização

de seus rebanhos e forneceram grande ajuda na realização dos meus experimentos.

Aos professores e amigos Ed Hoffman, José Vasconcelos (Zequinha), Visintin, Mario Binelli, Nelcio (denovo!), Roberto Sartori, Paula Papa, Gabriel Bó, João Henrique, Ciro Barros, entre muitos outros...pela valiosa contribuição em minha tese e profissionalização na área que escolhi para atuar...

Ao meu grande amigo Rodrigo Valarelli pela total confiança no meu trabalho ao patrocinar cursos de bovinos de leite que eu organizei ainda durante a graduação em veterinária, apoio este muito importante e que se estende até os dias de hoje, na realização dos meus experimentos como pós-graduando do Departamento de Reprodução na USP...

Aos demais colegas do VRA-USP, Marcella (Mazão), Renata, Alê, Marcílio Nichi, Priscila, Tati, Aníbal, Zeca, Maria Paula, Daniel Gentil, Fabíola, Gutão, Cris, Liege, Karina, Lílian, Marie, Nani, Paola, Paulo, Viviane, Weber, e muitos outros pela agradável convivência...e me desculpem as vezes que não pude ficar nos churrascos...

Aos colegas do Departamento do Dairy Scicence-UW/USA, Reno, Carla (como uma irmã pra mim!), Elena (sempre brava), Alexandre Pato (sempre calmo), Denise (também sempre brava), Andrew, Chris (sempre pronta a ajudar), pelo companherismo e ajuda incondicional...mesmo nas temperaturas congelantes de Wisconsin.

À empresa Nutricell-Campinas pela grande ajuda durante a fase de dinâmica folicular ao fornecer o ultra-som Falco 100-Pie Medical (ótimo equipamento)...

À Universidade de São Paulo e à Universidade de Wisconsin-UW por terem sido as instituições nas quais fui acolhido – mais uma vez – nesta e em muitas outras etapas de minha formação profissional...

À FAPESP pelo apoio financeiro (processo 05/59009-0), o que viabilizou meu sonho de realizar este Doutorado...

E em especial às caras amigas vacas de leite, especialmente as envolvidas nos experimentos de dinâmica folicular, as quais devo todo o respeito e muitas vezes até desculpas durante os experimentos mais intensos, por toda a aprendizagem, paciência e, sem dúvida, pelo companheirismo...

Muito obrigado a todos!

"Não desista. Faça outra vez,

outra vez e outra vez, até conseguir"

Luiz Marins

"A mente que se abre a uma nova idéia

jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, A. H. **Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção.** [Timed artificial insemination in high producing holstein cows]. 2008. 152 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A presente tese foi dividida em 5 Experimentos. Os objetivos do Experimento 1 foram avaliar a utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) e/ou do cipionato de estradiol (ECP) na dinâmica folicular e taxa de concepção de vacas holandesas submetidas a inseminação em tempo fixo (IATF). No D0, todos os animais (n = 782) receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR). Oito dias depois, o CIDR foi retirado e todos os animais receberam PGF2α. Simultaneamente, os animais foram divididos em 4 grupos: G1) eCG + ECP no Dia 8; G2) eCG no Dia 8 + GnRH após 48h; G3) ECP no Dia 8; G4) GnRH após 48h. Amostras de sangue e exames utlra-sonográficos foram realizados frequentemente em um subgrupo de animais (n = 96). As análises estatísticas de todos os experimentos foram efetuadas com o proc GLIMMIX e proc MIXED do SAS. O uso de eCG e o escore de condição corporal (ECC) dos animais afetaram as concentrações circulantes de progesterona no diestro. Os animais do G2 apresentaram maior taxa de concepção que os do G4 (33,8% vs. 28,9%). Além disso, para animais de menor ECC, ficou evidente o benefício da aplicação de eCG (G2 = 44,4% vs. G4 = 6,1%). No Experimento 2 (n = 26), o objetivo foi comparar o efeito da administração da eCG no dia da remoção do CIDR em animais de menor (2,0-2,5) ou maior (3,0-3,5) ECC. Foram avaliadas algumas características do corpo lúteo (CL) como o volume e histologia, assim como as concentrações plasmáticas de progesterona no diestro. Independentemente da condição corporal dos animais, a eCG aumentou o volume do CL e a concentração plasmática de progesterona no diestro. O ECC afetou negativamente o volume e concentração de progesterona sérica no diestro. Não foi encontrado diferença na proporção de células grandes/pequenas, assim como no fluxo sanguíneo no CL entre os grupos experimentais. No Experimento 3, foi comparado a taxa de concepção em vacas de leite de alta produção (n = 388) após o uso do protocolo G2 do Experimento 1 (Capítulo I), com ou sem adição de ECP no momento da retirada do CIDR (novo ou usado). Não foi verificado efeito da adição do tratamento com ECP e nem do tipo do

dispostivo na taxa de concepção. No Experimento 4 (n = 199), apesar no aumento verificado no diâmetro folicular no grupo tratado com GnRH 56h (17,8 mm) comparado com GnRH 48h (16,5 mm); e do atraso no momento da ovulação após a retirada do CIDR (GnRH 56h = 75,3h; GnRH 48h = 79,8h) não foi constatado qualquer diferença na concepção ao se atrasar a aplicação do GnRH de 48h para 56h em vacas inseminadas 16h depois do GnRH. No Experimento 5 (n = 185), a taxa de concepção não diferiu em animais que receberam o GnRH 48h ou 56h (momento da IATF) após a retirada do CIDR, indicando a possibilidade do emprego de um protocolo com apenas 3 manejos em vacas de leite de alta produção.

Palavras-chave: Vacas holandesas. Estradiol. Progesterona. Escore corporal. Corpo lúteo.

ABSTRACT

SOUZA, A. H. **Timed artificial insemination in high producing holstein cows.** [Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção]. 2008. 152 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The current thesys has been divided in 5 Experiments. Objectives of Experiment 1 were to evaluate the effects of equine chorionic gonadotropin (eCG) and/or estradiol cypionate (ECP) on follicular dymanics and conception rate in Holstein cows receiving fixed timed artificial insemination (TAI). On D0, all cows (n = 782) received 2 mg of estradiol benzoate (EB) and one intravaginal progesterone device (CIDR). Eight days later, CIDR was removed and all animals were treated with PGF2α. Simultaneously, animals were divided in 4 groups: G1) eCG + ECP on Day 8; G2) eCG on Day 8 + GnRH 48h later; G3) ECP on Day 8; G4) GnRH 48h later. Blood samples and ultrasound exams were frequently performed in a subset of the animals (n = 96). All the statistical analyses for all experiments were performed with proc GLIMMIX and proc MIXED of SAS. Equine chorionic gonadotropin (eCG) treatment and body condition score (BCS) affected circulating progesterone in the diestrus. Cows in G2 had greater conception rates than cows in G4 (33,8% vs. 28,9%). In addition, in cows with lower BCS, eCG seems to be even more affective (G2 = 44,4% vs. G4 = 6,1%). In Experiment 2 (n = 26), the objective was to compare the effect of eCG the day of CIDR removal in animals with lower (2,0-2,5) or higher (3,0-3,5) BCS. Some variables such as corpus luteum (CL) volume, histology and circulating progesterone concentration in the diestrus were evaluated. Regardless of the body condition of the animals, eCG increased CL volume and circulating progesterone concentration in the diestrus. BCS negatively affected CL volume and circulating progesterone. There were no differences in large/small CL cell ratio, as well as CL blood flow between experimental groups. In Experiment 3, it was compared conception rate in dairy cows (n = 388) after using the same protocol G2 from Experiment 1 (Chapter I), with or without an ECP treatment at the time of CIDR (new or used) removal. Both ECP treatment and type of CIDR did not significantly affected conception rates. In Experiment 4 (n = 199), despite the fact that follicular diameter was increased in group GnRH 56h (17,8 mm) compared with GnRH 48h (16,5 mm);

and of the delayed time of ovulation after CIDR removal (GnRH 56h = 75,3h; GnRH 48h = 79,8h), there were no differences in conception rates after delaying the GnRH treatment from 48h to 56h in cows inseminated 16h after GnRH. In Experiment 5 (n = 185), conception rate did not differ in animals that received GnRH 48h or 56h (at the time of TAI) after CIDR removal, indicating the possibility of using a protocol with only 3 handlings in high producing dairy cows.

.

Key-Words: Holstein cows. Estradiol. Progesterone. Body condition score. Corpus luteum.

LISTA DE FIGURAS

Figuras do Capítulo 1

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free-stall* - Fazenda localizada no estado do Paraná)..... 51

Figura 2 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free-stall* - Fazenda localizada no estado do Rio Grande do Sul)..... 51

Figura 3 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de ordenha* - Fazenda localizada no estado de São Paulo)..... 52

Figura 4 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de espera para ordenha* - Fazenda localizada no estado de São Paulo)..... 52

Figura 5 - Representação esquemática dos grupos experimentais..... 54

Figura 6 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Kamar*® - dispositivo que auxiliou na detecção de cio. Este dispositivo muda sua coloração para vermelho quando o animal aceita a monta)..... 55

Figura 7 - Dosagem de estradiol em 2 soros controles (de 100 e 500 pg/mL) em soro humano (linha contínua) e soro bovino (linha pontilhada). Coeficiente de correlação = 1..... 57

Figura 8 - A) Dia da emergência folicular (média ± erro padrão da média) após a retirada do dispositivo de P4 (colunas) e média de produção de leite conforme o momento da emergência folicular (●). B) Momento da emergência folicular após a inserção do CIDR conforme a classe de produção de leite (Kg/dia)..... 60

Figura 9 - Efeito (média ± erro padrão da média) da eCG (A) e do ECP (B) na concentração plasmática de estradiol desde o momento da retirada do CIDR (0h) até o momento da aplicação de GnRH (48h) em vacas de leite de alta produção. As aplicações de eCG e ECP ocorreram no momento da retirada do CIDR conforme o grupo experimental. ^{a,b} $P < 0,05$; ^{A,B} $P < 0,10$..... 62

Figura 10 - Momento da ovulação (média ± erro padrão da média) após a retirada do CIDR em animais que apresentaram o comportamento de estro (aceitação de monta) < 48h ou ≥ 48h e que não apresentaram cio. O comportamento de estro foi verificado por observação visual com o auxílio de um dispositivo para detecção de comportamento de aceitação de monta (Kamar®; Kamar Inc., Steamboat Springs, CO) a cada 4h a partir da retirada do CIDR até 96h. [a,b] médias diferem estatisticamente, P < 0,05; [x,y] desvios padrões diferem estatisticamente, P < 0,05……..... 64

Figura 11 - Distribuição do momento (h) da ovulação (média ± erro padrão da média) após a retirada do CIDR conforme o grupo experimental…. 65

Figura 12 - Efeito da eCG (média ± erro padrão da média) no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral subsequente ao uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção. [a,b] P < 0,05; [A,B] P < 0,10……..... 66

Figura 13 - Efeito (média ± erro padrão da média) do ECP no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral subsequente ao uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção……..... 67

Figura 14 - Efeito (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5; Edmonson et al., 1989) no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral após o uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção. [a,b] P < 0,05; [A,B] P < 0,10…..... 69

Figura 15 - Taxa de concepção para animais de condição corporal < 2,75 e ≥ 2,75 (escala de 1 a 5) conforme o grupo experimental. Letras diferentes entre colunas diferem estatisticamente; P < 0,05..... 73

Figuras do Capítulo 2

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Tie-stall*; Dairy Cattle Center, Universidade de Wisconsin-EUA)..... 84

Figura 2 - Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; condição corporal X tratamento com eCG)..... 86

Figura 3 - Concentração plasmática de eCG (média ± erro padrão da média) em vacas holandesas em lactação após aplicação de 400UI de eCG. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10……..... 90

Figura 4 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do tratamento com eCG no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) após a ovulação sincronizada. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10……..... 92

Figura 5 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (ECC) no volume do CL (A) e progesterona circulante (B) após a ovulação sincronizada. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10..... 93

Figura 6 - Imagem de CL com alto (A) ou baixo (B) fluxo sanguíneo (colorido) com utilização de ultra-sonografia color-Doppler..... 95

Figura 7 - Corte histológico de um CL no 11 dias após a ovulação. Coloração em HE. Note a presença de 2 tipos de células luteais: grande (G) e pequena (P)..... 96

Figuras do Capítulo 3

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de ordenha* - Fazenda localizada no estado de São Paulo)..... 105

Figura 2 - Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X tratamento com ECP)..... 107

Figuras do Capítulo 4

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free Stall* - Fazenda localizada no estado de São Paulo)..... 121

Figura 2 - Experimento 4 - fase 1, Dinâmica folicular. Delineamento experimental (fatorial 2 X 3; tipo de CIDR X Controle vs GnRH 48h vs GnRH 56h)……..... 124

Figura 3 - Experimento 4 – fase 2. Teste de fertilidade a campo: Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X GnRH 48h vs GnRH 56h). A inseminação em tempo fixo foi realizada 16h após a aplicação do GnRH..... 125

Figura 4 - Experimento 5. Teste de fertilidade a campo: Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X GnRH 48h vs GnRH no momento da IATF)……..... 126

Figura 5 - Aspecto de imagem ultra-sonográfica 7 dias após a retirada do CIDR de 2 animais que não ovularam após ao final do protocolo hormonal. A) Folículo luteinizado com presença de linhas ecogênicas internas (à esquerda); B) Aspecto de ovário cístico – folículo anovulatório sem luteinização (à direita)..... 129

Figura 6 - Distribuição do momento das ovulações após a retirada do CIDR para os grupos GnRH 48h, GnRH 56h e Controle – sem GnRH..... 130

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Capítulo 1

Tabela 1 - Características (média ± erro padrão da média) do pico de LH pré-ovulatório e do momento da ovulação conforme o grupo experimental…….. 61

Tabela 2 - Proporção de vacas que apresentaram cio antes de 48h após a retirada do CIDR, taxa de ovulação, diâmetro do folículo ovulatório (cm) 48h após a retirada do CIDR e momento da ovulação (h) após a retirada do CIDR..... 63

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 33 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção de acordo com a fazenda, época do ano e porcentagem de vacas com baixo escore corporal (ECC)..... 71

Tabela 4 - Taxa de concepção aos 33 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção..... 72

Tabelas do Capítulo 2

Tabela 1 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do tratamento com 400 UI de eCG nas características ultra-sonográficas e histológicas do CL de vacas holandesas de alta produção, 11 dias após a ovulação sincronizada..... 97

Tabela 2 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (maior = 3,0 a 3,5; menor = 2,0 a 2,5) nas características ultra-sonográficas e histológicas do CL de vacas holandesas de alta produção, 11 dias após a ovulação sincronizada..... 97

Tabelas do Capítulo 3

Tabela 1 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o verão, e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)..... 109

Tabela 2 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o inverno, e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)..... 110

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante duas épocas do ano (inverno e verão), e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)..... 111

Tabelas do Capítulo 4

Tabela 1 - Taxa de ovulação, diâmetro máximo do folículo ovulatório (cm) (média ± erro padrão da média) após a retirada do CIDR, momento da ovulação (h) após a retirada do CIDR (média ± erro padrão da média) e porcentagem de duplas ovulações…..... 129

Tabela 2 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com aplicação de GnRH 48h ou 56h após a retirada do CIDR (fatorial 2 x 2). Todos os animais foram inseminados 16h após a aplicação de GnRH..... 131

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com aplicação de GnRH 48h ou 56h após a retirada do CIDR (fatorial 2 x 2). Todos os animais foram inseminados 56h após a retirada do CIDR……..... 132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	benzoato de estradiol
BSP	bromosulfotaleína
CIDR	dispositivo intravaginal liberador de progesterona
CL	corpo lúteo
D	dia
E2	estradiol
ECC	escore de condição corporal
eCG	gonadotrofina coriônica equina
ECP	cipionato de estradiol
EPM	erro padrão da média
FD	folículo dominante
FS	folículo subordinado
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama / gravitacional
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
h	hora
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HE	hematoxilina-eosina
IM	intramuscular
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
Kg	kilograma
LH	hormônio luteinizante
µg	micrograma
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
n	número de unidades experimentais
ng	nanograma
NRC	Nutrient requirements of dairy cattle
ºC	grau Celsius

P	nível de significância
P4	progesterona
pg	picograma
PGF2α	prostaglandina F dois alfa
r	coeficiente de correlação
SAS	statystical analysis system
UI	unidades internacionais
US	ultra-som/ ultra-sonografia
vs	versus

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcentagem
β	Letra grega Beta
α	Letra grega Alpha
π	Letra grega PI

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 29

2 **REVISÃO DE LITERATURA** 34

2.1 DIFERENTES TIPOS DE ÉSTERES DE ESTRADIOL 34

2.1.1 Uso de estrógenos como indutor ovulatório em protocolos de IATF 36

2.1.2 O estradiol e o comportamento de estro 39

2.1.3 O efeito da lactação no metabolismo hepático de esteróides 40

2.1.4 O papel do estradiol no transporte espermático 40

2.1.5 Os efeitos do estradiol no corpo lúteo 41

2.2 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (ECG) 42

2.2.1 Os efeitos da eCG no corpo lúteo 44

2.2.2 Uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em programas reprodutivos para bovinos 45

CAPÍTULO 1 47

1 HIPÓTESE 48

2 OBJETIVOS 49

3 MATERIAIS E MÉTODOS 50

3.1 ANIMAIS E MANEJO 50

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS 53

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS 53

3.4 FASE 1 - DINÂMICA FOLICULAR 54

3.5 FASE 2 - TESTE DE FERTILIDADE A CAMPO 56

3.6 DOSAGENS HORMONAIS 56

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 57

4 RESULTADOS 59

4.1 DINÂMICA FOLICULAR 59

4.2 TESTE DE FERTILIDADE A CAMPO 70

5 DISCUSSÃO 74

6 CONCLUSÕES 80

CAPÍTULO 2 81
1 **HIPÓTESE** 82
2 **OBJETIVOS** 83
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 84
3.1 ANIMAIS E MANEJO 84
3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS 85
3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS 85
3. 4 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS CONVENCIONAIS E COLETA DE SANGUE 86
3.5 DOSAGENS HORMONAIS 87
3.6 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO COLOR-DOPPLER 87
3.7 BIÓPSIA E MICROSCOPIA DO TECIDO LUTEÍNICO 88
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 89
4 RESULTADOS 90
4.1 CONCENTRAÇÃO CIRCULANTE DE ECG 90
4.2 VOLUME DO CL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA 91
4.3 FLUXO SANGUÍNEO NO CL 94
4.4 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO CL 95
5 DISCUSSÃO 98
6 CONCLUSÕES 101
CAPÍTULO 3 102
1 HIPÓTESE 103
2 OBJETIVOS 104
3 MATERIAIS E MÉTODOS 105
3.1 ANIMAIS E MANEJO 105
3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS 106
3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS 106
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 107
4 RESULTADOS 108

4.1 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O VERÃO 108

4.2 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O INVERNO 109

4.3 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O VERÃO E O INVERNO (DADOS COMBINADOS) 110

5 DISCUSSÃO 112

6 CONCLUSÕES 116

CAPÍTULO 4 117

1 HIPÓTESES 118

2 OBJETIVOS 119

3 MATERIAIS E MÉTODOS 120

3.1 ANIMAIS E MANEJO 120

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS 121

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS 121

3.3.1 **Experimento 4 - fase 1: Dinâmica folicular (Controle – sem aplicação de GnRH X GnRH 48h X GnRH 56h)** 122

3.3.2 **Experimento 4 – fase 2: Teste de fertilidade a campo – tratamento com GnRH 48h ou 56h após a remoção do CIDR e IATF 16h após o GnRH** 122

3.3.3 **Experimento 5: Teste de fertilidade a campo – tratamento com GnRH 48h (4 manejos) ou no momento da IATF (3 manejos)** 123

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 126

4 RESULTADOS 128

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTO 4, FASE 1 – DINÂMICA FOLICULAR 128

4.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 4, FASE 2 – CIDR NOVO VS USADO X GNRH 48H OU 56H (IATF 16H APÓS O GNRH) 130

4.3 RESULTADOS EXPERIMENTO 5 – CIDR NOVO OU USADO X GNRH 48H (4 MANEJOS) OU GNRH 56H (3 MANEJOS; GNRH APLICADO NO MOMENTO DA IATF) 132

5 DISCUSSÃO 133

6 CONCLUSÕES 136

REFERÊNCIAS 139

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção em vacas de leite que ocorreu nas últimas décadas decorrente da melhora nas técnicas de manejo e da seleção genética têm sido associado a uma menor eficiência reprodutiva (WASHBURN et al., 2002; SARTORI et al., 2002a; LOPEZ et al., 2004). Uma das causas desta menor eficiência reprodutiva em rebanhos de alta produção é a diminuição da expressão e da detecção de cios, principalmente em animais de mais alta produção leiteira (NEBEL et al., 1997; DRANSFIELD et al., 1998; LOPEZ et al., 2004). Para tentar solucionar o problema da baixa taxa de serviço devido à ineficiência na detecção de cios, foram desenvolvidos muitos protocolos hormonais que sincronizam o aparecimento do estro com o uso de prostaglandinas (ODDE, 1990). Mais recentemente, Pursley et al. (1995) desenvolveram um protocolo hormonal chamado Ovsynch, que permite a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após o uso de uma combinação de tratamentos com GnRH e PGF (GnRH - 7dias - PGF2α - 2 dias - GnRH - 16 horas - IATF). Outra linha de tratamentos hormonais que permitem a IATF, utiliza implantes ou dispositivos contendo progestágenos associados à tratamentos com estradiol para sincronizar a emergência de uma nova onda de cresimento folicular (BÓ et al., 1995). Todos estes tipos de 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 de bovinos de leite e de corte. Porém, mesmo com o uso destes protocolos hormonais, as baixas taxas de concepção continuam a ser um problema, principalmente em bovinos de leite de alta produção sob sistema confinado, nos quais as taxas de concepção anuais não ultrapassam 35% em quase todo o mundo. O problema de baixas taxas de concepção em bovinos leiteiros parece ter múltiplas causas; porém, uma das possíveis razões para a baixa fertilidade pode ser decorrente da baixa concentração de estradiol (E2) circulante no pró-estro quando protocolos para IATF são utilizados. Isso pode ocorrer devido a indução prematura da ovulação pelos protocolos de IATF. Nos protocolos de sincronização os animais ovulam cerca de 24 a 30 horas antes do pico de estradiol natural, como sugerem os dados de Colazo et al. (2003).

Além do problema da ovulação prematura do folículo dominante em protocolos para IATF, os níveis de E2 no pró-estro de vacas de alta produção são mais baixos que animais não lactantes (SARTORI et al., 2002a) e animais de baixa produção (LOPEZ et al., 2004), provavelmente devido à alta taxa de metabolismo hepático dos esteróides (SANGSRITAVONG et al., 2002). Assim, estas menores concentrações de E2 no pró-estro podem estar causando diminuição na eficiência do transporte espermático pelo trato uterino (HAWK et al., 1975b), menor taxa de fertilização dos oócitos (SARTORI et al., 2002b) e menor qualidade embrionária (RYAN et al., 1993; SARTORI et al., 2002b).

Existem alguns relatos de efeitos benéficos de maiores concentrações de estradiol antes da ovulação na fertilidade (HAWK et al., 1975b; RYAN et al., 1993; SARTORI et al., 2002b). Por exemplo, uma variação do protocolo Ovsynch, conhecido como “Heatsynch” utiliza um tratamento com um éster de estradiol (cipionato de estradiol - ECP), como substituto ao GnRH na indução da ovulação sincronizada (PANCARCI et al., 2002). O “Heatsynch” e outros protocolos que utilizam outros tipos de estrógenos como indutores de ovulação (BARROS et al., 2000) aumentam as concentrações sanguíneas de estradiol no pró-estro, sendo que existem relatos de melhora na fertilidade em vacas de leite (CERRI et al., 2004) e de corte (AHMADZADEH et al., 2004) com o uso destes protocolos e de suas variações. De maneira similar, alguns estudos (HANLON et al., 1996; COLAZO et al., 2004) demonstraram efeitos benéficos da suplementação com estradiol no final de tratamentos com dispositivos contendo progesterona. Por exemplo, Colazo et al. (2004), trabalhando com um grande número de novilhas de corte da raça Angus e cruzadas Angus (n = 983), demonstrou que o tratamento com 0.5 mg de ECP 24h após a retirada do CIDR promoveu taxas de concepção cerca de 15% maiores que os animais que receberam apenas uma injeção de GnRH no momento da IA. Portanto, existe a possibilidade do aumento nas taxas de concepção, independente do tipo do protocolo de sincronização de ovulação utilizado, após a suplementação com estrógenos no período periovulatório.

Além do eventual aumento da taxa de concepção, o uso de ésteres de estradiol de longa ação pode proporcionar a diminuição do número de manejos necessários durante os tratamentos hormonais em protocolos de IATF. Neste sentido, um estudo recente (COLAZO et al., 2003), observaram que a utilização de baixas doses de

ECP (0,5 mg) no momento da retirada do CIDR ou 24h mais tarde causou ovulação sincronizada e promoveu taxas de concepção similares à utilização de benzoato de estradiol 24h após a retirada de dispositivos de progesterona. Outro estudo, utilizando vacas Nelore, estudou a dinâmica folicular após o tratamento com o benzoato de estradiol (BE) ou ECP, administrados como indutores de ovulação na retirada do dispositivo de P4 ou 24h após (REIS et al., 2004; MARTINS et al., 2005). Estes estudos, baseados em exames ultra-sonográficos frequentes, demonstraram que o momento de ovulação nos animais que receberam ECP no momento da retirada do implante de P4 ou BE 24h após, foi essencialmente igual. De maneira similar, outros estudos indicam que o tratamento com ECP no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 têm sido utilizado com sucesso em vacas de corte em substituição ao BE administrado 24h após (MARQUES et al., 2004; PENTEADO et al., 2005). Portanto, todos estes experimentos fornecem fortes indícios da viabilidade da utilização do ECP no momento da retirada de implantes auriculares e/ou dispositivos intravaginais contendo progesterona ou progestágenos. Além disso, o uso do ECP no momento da retirada destes dispositivos de progesterona tem a vantagem de possibilitar a redução do número de vezes na qual os animais necessitam ser manejados se comparado com os protocolos tradicionais.

O alto metabolismo hepático em vacas de alta produção afeta tanto as concentrações de E2 no pró-estro, como também diminui as concentrações de P4 circulantes no diestro. Sangsritavong et al. (2002) mostraram que a alta taxa de metabolismo hepático de esteróides é a principal causa de menores concentrações sanguíneas de P4 em vacas de alta produção. Muitos pesquisadores já relataram os efeitos negativos de baixas concentrações de P4 após a ovulação para o estabelecimento da gestação (MANN; HARESIGN, 2001). Deste modo, uma possível solução para as baixas concentrações de progesterona no diestro seria aumentar a produção de progesterona pelo corpo lúteo após a ovulação, de modo a superar a taxa de metabolização deste hormônio pelo fígado, principalmente em vacas de leite de alta produção. Neste sentido, alguns pesquisadores utilizaram a eCG (400 UI) na ocasião da retirada do tratamento com progesterona para estimular o crescimento folicular e aumentar o tamanho (SÁ FILHO et al., 2004) e a capacidade esteroidogênica (BARUSELLI et al., 2004) do corpo lúteo (CL) em vacas de corte. Estes autores verificaram que animais tratados com eCG tiveram maiores

concentrações sanguíneas de P4 no diestro subsequente à IATF. Estes resultados estão de acordo com várias pesquisas (BARUSELLI et al., 2003; SÁ FILHO et al., 2004; MARQUES et al., 2005; PENTEADO et al., 2005) que relataram aumentos na taxa de concepção em vacas e novilhas de corte, especialmente em animais em anestro e de baixa condição corporal (BARUSELLI et al., 2004), que receberam eCG na retirada do dispositivo intravaginal de P4. Além disso, outros estudos utilizando receptoras de embrião, também relataram o efeito luteotrófico da eCG resultando no aumento da taxa de concepção após sua utilização em associação ao protocolo de sincronização de receptoras de corte (BARUSELLI et al., 2000). Infelizmente, em vacas de leite, mesmo com uma grande porcentagem de anestro durante o início do período das inseminações (~ 45% para animais de baixa condição corporal e ~ 20% para animais com boa condição corporal; LOPEZ et al., 2004) e das menores concentrações de esteróides devido ao seu alto metabolismo hepático, existe falta de relatos na literatura a respeito dos potenciais benefícios do tratamento com eCG associado a protocolos para IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIFERENTES TIPOS DE ÉSTERES DE ESTRADIOL

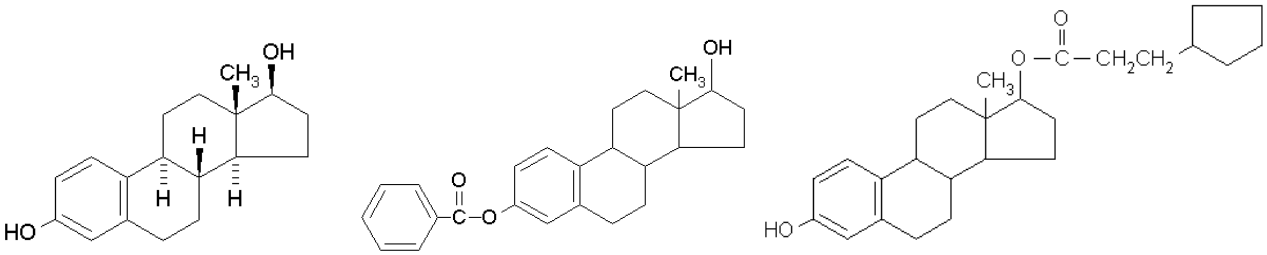
O estradiol é um hormônio esteróide, ou seja, faz parte de um grupo de lipídeos que contém um anel químico chamado ciclopentanoperhidrofenantreno. Em bovinos e outras espécies, o estradiol é sintetizado principalmente nos folículos dominantes nos ovários por uma série de enzimas que convertem o colesterol em pregnenolona, depois em andrógenos e finalmente em estradiol. A molécula de estradiol é caracterizada por um anel aromático ligado a um grupo fenólico no carbono 3. Além dos ovários, existem muitos outros tecidos que podem produzir estrógenos como a placenta, o córtex adrenal, os testículos, o cérebro, os ossos, o tecido adiposo, a pele e outros tecidos corpóreos. O estradiol apresenta muitas funções na fisiologia reprodutiva como a expressão do cio, a liberação de GnRH/LH, e expressão de características sexuais secundárias. Além disso, o estradiol é importante na lactogênese, na estrutura e formação dos ossos (antagoniza os efeitos do hormônio paratireóide), no desenvolvimento cerebral e em muitas outras funções no corpo (NELSON et al., 2001).

Existem 3 tipos de estrógenos que ocorrem normalmente na natureza: estrona, estradiol-17β e estriol. Porém, estes estrógenos têm estrutura química e atividade biológica distintas. Por exemplo, o estradiol-17β é o mais potente dentre estes 3 tipos de estradiol, sendo 2 vezes mais potente que a estrona, e cerca de 10 vezes mais potente que o estriol (DAXENBERGER et al., 2001). A atividade biológica de certo tipo de estradiol é determinada pela sua estrutura molecular. Assim, a distância entre os átomos de oxigênio na posição do carbono 3 e 17 é um fator determinante da sua atividade biológica. Além disso, o grupo químico que esta conectado ao anel aromático também afeta a atividade biológica de um determinado tipo de estradiol.

A meia-vida do estradiol na corrente sanguínea também depende da sua estrutura molecular, sendo mais influenciada pela polaridade da sua molécula. Por sua vez, a polaridade de um composto químico depende do tamanho da molécula (moléculas maiores tendem a ser menos polares), da simetria das ligações

covalentes presentes na molécula (moléculas mais simétricas em geral são menos polares), e presença de anéis aromáticos (estes quando presentes tendem a diminuir a polaridade da molécula). Por exemplo, se induzir-mos a esterificação do grupo hidroxila no C-17, a molécula final será menos polar (menos hidrofílica) e, portanto, esta molécula vai ficar presente na corrente sanguínea por maiores períodos de tempo.

Alguns exemplos de estrógenos que normalmente são utilizados em bovinos de leite e corte em programas reprodutivos são: estradiol-17β, benzoato de estradiol e cipionato de estradiol (Figura 1).



(a) **(b)** **(c)**

Figura 1 - Estrutura química do (a) estradiol-17β, (b) benzoato de estradiol, e (c) cipionato de estradiol (adaptado de SOUZA et al., 2005)

Apesar de algumas similaridades entre estas moléculas de estradiol como a presença do anel de ciclopentanoperhidrofenantreno, existe uma grande diferença em termos de peso molecular (kDa) entre estes três tipos de estradiol (estradiol-17β = 272, benzoato de estradiol = 376 e cipionato de estradiol = 397). Além disso, é importante lembrar que somente a molécula de estradiol-17β é biologicamente ativa, e que os ésteres de estradiol como por exemplo o benzoato e o cipionato de estradiol somente produzirão seus efeitos biológicos após a liberação da molécula de estradiol-17β de suas respectivas moléculas por meio da ação da enzima esterase no fígado. Esta informação é muito importante pois a porcentagem de

estradiol biologicamente ativo (estradiol-17β) após a dissociação efetuada pela enzima esterase é diferente entre estas três moléculas de estradiol apresentadas na figura 1. Sendo assim, o tratamento com de um determinado animal com 1mg de benzoato de estradiol produzirá cerca de 28% menos estradiol biodisponível, e 1 mg de cipionato de estradiol produzirá cerca de 32% menos estradiol ativo se comparado ao tratamento com 1mg de estradiol-17β. Estas diferenças na quantidade de estradiol-17β disponível em cada uma destas moléculas podem determinar a ação farmacológica destes diferentes compostos estrogênicos.

Assim, devido ao seu pequeno peso molecular (< 1000 daltons) e polaridade (altamente lipofílico), o estradiol penetra facilmente pelas membranas biológicas. Estas características químicas são muito importantes, pois o estradiol tem que se ligar a receptores protéicos presentes no núcleo das células para regular a expressão gênica (HART et al., 2002). Em seguida, a ação dos estrógenos é mediada através de dois tipos de receptores nucleares (receptores α e β; KUIPER et al., 1996). O receptor α pode ser encontrado em muitos tecidos como por exemplo no trato reprodutivo, no fígado, no cérebro, nos ossos e mesmo no sistema cardiovascular (KATZENELLENBOGEN et al., 2000). Os receptores do tipo β também podem ser encontrados nestes tecidos e também nos ovários, próstata, rins, pulmões, e intestino (GUSTAFSSON, 2000). A ligação do estradiol no seu receptor causa a dissociação de proteínas do tipo “heat shock”, o que permite a dimerização dos seus receptores. Além disso, o estradiol recruta co-ativadores e acetiltransferases de proteínas nucleares ou histonas, resultando em acetilação destas proteínas e descondensação da cromatina (COWLEY et al., 1997). Estas mudanças permitem a transcrição específica de mRNA da área de DNA que foi ativada pelo estradiol. Esta ativação do mRNA induz a formação de proteínas que irão produzir as mudanças na fisiologia celular características do estradiol.

2.1.1 Uso de estrógenos como indutor ovulatório em protocolos de IATF

Na ausência de progesterona, uma injeção de estradiol pode gerar a liberação de GnRH/LH e causar a ovulação de uma folículo dominante (MOENTER et al., 1990). Deste modo, o cipionato de estradiol (ECP) e outros tipos de estradiol como o

benzoato de estradiol (BE) e o estradiol-17β (E2-17β), têm sido utilizados como substitutos do tratamento com GnRH para induzir a ovulação sincronizada em vários tipos de protocolos para IATF. Além disso, apesar dos tratamentos com estradiol serem pouco utilizados em certos países devido a algumas restrições legais, eles são bastante utilizados em países da America do Sul como o Brasil e Argentina. A maior razão para esta substituição é o menor custo dos estrógenos se comparado aos compostos análogos do GnRH.

Porém, devido à alta frequência do uso destes 3 tipos de estradiol em protocolos hormonais, é importante saber a diferença no perfil de concentração de estradiol circulante alcançada após o uso destes diferentes tipos de estradiol em bovinos. Neste sentido, Souza et al. (2005), trabalhando com vacas de leite de alta produção, compararam as concentrações circulantes de estradiol após o tratamento com uma única dose de 1mg de estradiol-17β, benzoato de estradiol e cipionato de estradiol. Estes autores observaram características importantes quanto ao padrão de concentração de estradiol no sangue de bovinos de alta produção conforme o tipo de estrógeno. Em geral, foi observado que o estradiol-17β apresentou maior pico e menor meia-vida se comparado ao cipionato de estradiol; e que o benzoato de estradiol apresentou valores intermediários para estas mesmas variáveis. Estas informações podem determinar o momento e o padrão de ovulação após o uso destes diferentes indutores de ovulação em tratamentos hormonais que permitem a inseminação em tempo fixo.

Os protocolos que utilizam o ECP em associação a tratamentos com GnRH e PGF são normalmente chamados de “Heatsynch” (PANCARCI et al., 2002). Esta terminologia tem origem no Inglês “heat” que significa cio ou estro, pois uma maior proporção de animais apresenta sinais de cio quando são tratados com ECP ao invés do GnRH para a indução de ovulação. A dosagem ideal de ECP a ser utilizada como indutor ovulatório foi testada em novilhas e vacas de leite anteriormente (LOPES et al., 2000). Estes pesquisadores verificaram que, para vacas de leite em lactação, o ECP na dose de 1 mg (i.m.) foi considerado a dose ideal para causar ovulação (LOPES et al., 2000). A maior proporção de animais em cio após o uso do ECP é devido às maiores concentrações de estradiol circulante no pró-estro decorrentes da aplicação de estradiol exógeno. No Heatsynch, 1 mg de ECP é injetado 24h após a PGF2α, e a IATF ocorre 48h após o tratamento com ECP. Muitos pesquisadores têm demonstrado taxas de concepção bastante satisfatórias

após o uso do ECP no Heatsynch (LOPES et al., 2000; PANCARCI et al., 2002; CERRI et al., 2004).

Neste sentido, um experimento recente (SOUZA et al., 2007), utilizando um grande número de vacas de leite de alta produção (n = 1084), comparou o protocolo Ovsynch (GnRH – 7dias – PGF2α – 56h horas – GnRH – 16 horas – IATF) com ou sem suplementação com estradiol-17β 8h antes do último tratamento com GnRH. Cerca de metade dos animais recebeu aleatoriamente uma injeção de 1 mg de estradiol-17β no final do protocolo Ovsynch. Estes pesquisadores demonstraram que a suplementação com estradiol próximo ao momento da ovulação sincronizada melhorou as taxas de concepção em animais com com baixa condição corporal, animais submetidos à primeira IA pós-parto e primíparas. Ainda, o aumento nas taxas de concepção após a suplementação com estradiol dependeu do tamanho do folículo ovulatório no momento do último GnRH. Sendo que vacas que ovularam folículos de tamanho intermediário (14 a 19 mm) apresentaram melhores respostas à suplementação com estradiol. Outro resultado importante deste experimento foi que o estradiol pode funcionar como um “selecionador” de animais com melhor fertilidade, pois foi observado que os animais que não apresentaram comportamento de estro após o tratamento com estradiol apresentaram menores taxas de concepção se comparado aos animais que apresentaram comportamento de estro no protocolo Ovsynch suplementado com estradiol. O mesmo não ocorreu durante o uso do protocolo Ovsynch convencional, onde as taxas de concepção dos animais que apresentaram ou não o comportamento de estro não foram estatisticamente diferentes.

De maneira similar, os ésteres de estradiol são utilizados no final de tratamentos hormonais à base de implantes auriculares e/ou dispositivos intravaginais contendo progesterona ou progestágenos. Muitos relatos (HANLON et al., 1996; BARUSELLI et al., 2003; COLAZO et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2004; PENTEADO et al., 2005) obtiveram bons resultados após a utilização do ECP no final dos tratamentos hormonais.

Portanto, muitas evidências indicam que, independente do tipo do protocolo de sincronização de ovulação utilizado, existe a possibilidade de se melhorar as taxas de concepção após a suplementação com estrógenos no período periovulatório.

2.1.2 O estradiol e o comportamento de estro

O folículo pré-ovulatório é responsável pelo aumento do estradiol na circulação durante o pró-estro. Os maiores níveis de estradiol causam o pico de GnRH/LH e o comportamento de estro (MOENTER et al., 1990). O cio é um evento de receptividade sexual que pode durar de 30 minutos a 36h (DRANSFIELD et al., 1998). O estradiol tem um papel importante na expressão de cio em vacas e outros ruminantes (KYLE et al., 1992). Além disso, vários estudos verificaram que existe uma alta associação entre a concentração sanguínea de estradiol e o comportamento de estro (ALLRICH et al., 1994; LYIMO et al., 2000). Porém, assim como o estradiol, o nível de produção de leite tem um papel determinante na expressão do cio.

Pesquisas mais recentes (LOPEZ et al., 2004), utilizando um transmissor de rádio para a detecção contínua do comportamento de aceitação da monta (HeatWatch®), observaram que maiores produções de leite estão negativamente associadas com a duração do comportamento do cio ($r = - 0,51$; $P < 0,01$). Lopez et al. (2004) observaram ainda que animais com produção de leite entre 25 a 30 kg/dia apresentaram comportamento de estro por cerca de 15h. Porém, animais com produção entre 50 a 55 kg/dia apresentaram comportamento de estro por menos de 3h. Assim, Lopez et al. (2004) argumentaram que esta mudança na fisiologia do comportamento de estro conforme o nível de produção leiteira do animal pode estar relacionado às maiores taxas de metabolismo hepático de esteróides em vacas de mais alta produção. Porém, estes autores também relatam que existe a possibilidade de que o CL de vacas de maior produção esteja produzindo menores quantidades de progesterona. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os fatores controladores dos níveis de progesterona circulante em vacas de leite de alta produção.

2.1.3 O efeito da lactação no metabolismo hepático de esteróides

O fígado é o principal órgão que metaboliza estrógenos e progesterona (FREETLY; FERRELL, 1994). Associado a isto, existem fortes evidências de que a ingestão de matéria seca de um animal esta intimamente ligada ao seu nível de produção de leite (r = 0,88; HARRISON et al., 1990). Portanto, Sangsritavong et al. (2002) examinou a hipótese de que o aumento do fluxo sanguíneo pelo fígado devido a uma maior ingestão de matéria seca poderia ser a causa dos baixos níveis de estradiol e progesterona em vacas de alta produção. Estes pesquisadores utilizaram a bromosulfotaleína (BSP) para estimar o fluxo sanguíneo hepático, e observaram que vacas secas (não lactantes) têm cerca da metade do fluxo sanguíneo hepático se comparado com vacas em lactação (1000 to 1200 L/h vs. 1600 to 2000 L/h). Eles também observaram que a concentração de progesterona e estradiol circulantes são menores em vacas em lactação que em vacas não lactantes, provavelmente, devido a uma maior metabolização hepática. Os mesmos autores especularam que estes baixos níveis de progesterona e estradiol podem ser a causa de muitas anormalidades fisiológicas como por exemplo a diminuição do comportamento do cio ou estro (devido às menores concentrações de estradiol no período peri ovulatório), aumento de duplas ovulações (devido às menores concentrações de progesterona circulante próximo ao momento do desvio folícular), e aumento nas taxas de morte embrionária (devido às menores concentrações de progesterona circulante após a ovulação), as quais podem estar afetando o desempenho reprodutivo das vacas de leite modernas.

2.1.4 O papel do estradiol no transporte espermático

O transporte espermático através do trato reprodutivo feminino é fundamentalmente dependente da motilidade do trato (HAWK, 1987). Foi demonstrado que o estradiol pode alterar a motilidade do trato reprodutivo (HAWK et al., 1975a). No mesmo estudo, estes pesquisadores observaram que o tratamento com estradiol pode aumentar não somente o número de contrações uterinas, como

também o número de contrações em direção ao oviduto, o que poderia favorecer ainda mais o transporte espermático para o local da fertilização. Hawk et al. (1975b) relataram que a suplementação com estradiol foi benéfica para o transporte espermático no trato uterino de ovelhas. Neste estudo, a administração de pequenas doses de E2-17β duplicou o número de espermatozóides que alcançaram a cérvix, e aumentou em oito vezes o número de espermatozóides que alcançaram o oviduto. Outros autores encontraram efeitos positivos de maiores níveis de estradiol na fertilidade (GADDUM-ROSSE et al., 1981; ORIHUELA et al., 1999). Porém, outros experimentos não observaram vantagens após a utilização de estradiol exógeno na fertilidade (LANGFORD et al., 1980).

2.1.5 Os efeitos do estradiol no corpo lúteo

Tratamentos com estradiol foram utilizados originalmente em associação com progestágenos para controlar a fase luteínica de bovinos (WILTBANK et at., 1965). Desta forma, Wiltbank et al. (1961) observaram que a capacidade dos tratamentos com estradiol em causar luteólise depende da dose, do tipo de estrógeno e da fase do ciclo estral do animal no momento do tratamento.

Os mecanismos responsáveis pela luteólise após o tratamento com estradiol estão relacionados à capacidade do estradiol em aumentar a responsividade do endométrio à ocitocina, provavelmente devido ao aumento dos receptores de ocitocina neste tecido (HIXON et al., 1987). É sabido que a ocitocina pode regular a liberação de PGF2α pelo endométrio (SILVIA et al., 1991; TYSSELING et al., 1998). Assim, a PGF2α produzina no endométrio alcança o CL por meio de transporte local pela veia uterina até a artéria ovariana (GINTHER et al., 1973). Portanto, o momento da luteólise e a duração do ciclo estral em bovinos parece ser determinado pela liberação de PGF2α pelo útero, o qual depende da indução de receptores de ocitocina no endométrio por estímulos estrogênicos.

Porém, alguns distúrbios reprodutivos em bovinos estão relacionados com este sistema de “comunição” entre o útero e o CL. Assim, os chamados ciclos estrais de curta duração ou ciclos estrais curtos (de 7 a 10 dias) são comuns em bovinos, principalmente, no pós-parto (SAVIO et al., 1990). Este tipo de distúrbio na duração

da fase luteal esta relacionada com perdas reprodutivas e menores taxas de concepção mesmo após o uso de protocolos do tipo Ovsynch (GUMEN et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que os animais em anestro estão muito mais propensos a apresentar ciclos curtos, mesmo após a utilização de hormônios que induzem a ovulação sincronizada (GUMEN et al., 2003). Alguns pesquisadores demonstraram que este fenômeno ocorre devido ao aumento precoce dos receptores de ocitocina no ciclo estral (ZOLLERS et al., 1991), seguido de uma liberação antecipada de PGF2α pelo endométrio (ZOLLERS et al., 1989). Porém, uma pré-exposição com progesterona pode evitar o aparecimento dos ciclos curtos (SILVIA et al., 1991).

Porém, dependendo da fase do ciclo estral, maiores níveis de liberação de estradiol parecem ser benéficos para a função do CL em bovinos. Vários estudos têm mostrado que a suplementação com estradiol perto da primeira ovulação no pós-parto é capaz de estender a fase luteínica e a produção de P4 pelo corpo lúteo (MANN; HARESIGN, 2001), provavelmente pelo retardamento na liberação de PGF2α pelo útero (MANN; LAMMING, 2000). Esta liberação de PGF2α mais tardiamente no ciclo estral deve estar relacionada com uma menor expressão de receptores para ocitocina no endométrio de vacas que experimentaram maiores concentrações sanguíneas de estradiol no pró-estro (MANN; LAMMING, 2000). Portanto, de acordo com estes pesquisadores, o uso de estradiol próximo ao momento da ovulação pode melhorar a função luteínica.

2.2 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (ECG)

Cole e Hart (1930) foram os primeiros a descrever a presença de uma substância de ação gonadotrófica no soro de éguas e outros equídeos concepção. A gonadotrofina sérica de éguas prenhas (PMSG) é um hormônio glicoprotéico que é secretado pelos cálices endometriais de equinos gestantes. Posteriormente, Allen e Moor (1972) observaram que este hormônio era produzido pela parte materna da placenta e concluíram que uma melhor terminologia para esta glicoproteína seria gonadotrofina coriônica equina (eCG). Mais especificamente, estes autores descobriram que a eCG é produzida pelas células trofoblásticas presentes nos

cálices endometriais de éguas prenhez. A eCG, assim designada, é composta de duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos) e têm ação de LH e FSH na mesma molécula (GOSPODAROWICS, 1972; LEGARDINIER et al., 2005). As ações de FSH e LH desta gonadotrofina equina também foi demonstrada em outras espécies (WARD; MOORE, 1979). Em equinos, o pico de liberação de eCG ocorre ao redor dos 60 dias de gestação, mas o aumento na liberação se dá ao redor de 40 dias de gestação e perdura até aproximadamente os 130 dias de gestação (MURPHY; MARTINUK, 1991). Assim, a eCG causa ovulação ou luteinização de folículos, com consequente aumento da progesterona circulante em equinos (URWIN; ALLEN, 1982). Porém, as quantidades de ácido siálico e carboidrato podem variar bastante de equino para equino, conforme o estágio de gestação e conforme o tecido no qual foi coletado a molécula de eCG (MURPHY; MARTINUK, 1991). Ainda, a quantidade de eCG circulante varia bastante conforme a raça do animal, a sua idade e conforme a presença de gestações gemelares, que podem alterar a quantidade de eCG na circulação. Por exemplo, animais de tração possuem níveis circulantes de eCG menores que em animais de menor peso corporal (MURPHY; MARTINUK, 1991).

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 β da molécula de eCG, o que proporciona uma grande meia vida a este composto químico (WARD; MOORE, 1979; MURPHY; MARTINUK, 1991). Na verdade, um experimento realizado por Martinuk et al. (1991), utilizando uma enzima chamada neuraminidase para retirar diferentes porcentagens de ácido siálico (que é o principal componente de carboidrato da eCG) da molécula de eCG, mostraram que a meia-vida desta gonadotrofina equina esta intimamente relacionada à quantidade de ácido siálico presente na sua molécula. Por exemplo, quando cerca de 80% do ácido siálico foi retirado da molécula, os níveis circulantes de eCG já eram basais 1h após sua administração. Porém, no grupo controle (sem incubação com neuraminidase), altos níveis circulantes de eCG estavam presentes mesmo 120h após o tratamento com eCG exógeno. Ainda, além do alto peso molecular e da presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida (LEGARDINIER et al., 2005).

Devido a todos estes fatores, a meia-vida da eCG quando aplicado em bovinos é longa (cerca de 40h; MENZER et al., 1979).

2.2.1 Os efeitos da eCG no corpo lúteo

A eCG parecer ter função luteotrófica em equinos e outras espécies, sendo possível verificar aumentos nas concentrações circulantes de progesterona após o aumento natural ou por via de administração exógena da eCG (MURPHY; MARTINUK, 1991). Estas informações estão de acordo com um estudo recente (DAELS et al., 1998), o qual demonstrou que a eCG tem importante ação luteotrófica durante a gestação de éguas.

A estrutura da eCG é muito parecida com a estrutura do LH equino (BOUSFIELD et al., 1996). Apesar da similaridade com o LH equino, a eCG apresenta função de FSH e LH em equinos e em outras espécies (GONZALEZ-MENICO et al., 1979; WARD; MOORE, 1979). Porém, quantidade de atividade biológica do tipo LH da molécula de eCG parece estar ligada com a quantidade de ácido siálico presente na sua estrutura molécular, pois foi demonstrado que com a utilização de enzimas que digerem o ácido siálico, ocorre um aumento da ação de LH na molécula da eCG, porém mais experimentos são necessários para confirmar este fenômeno.

Independente dos efeitos luteotróficos da eCG, ela pode induzir a formação de anticorpos pelo organismo quando aplicado de maneira exógena em bovinos e outras espécies. Assim, quando a eCG é administrada em outras espécies, devido à sua origem heteróloga, à alta porcentagem de carboidratos presentes em sua molécula e ao seu relativo grande tamanho molecular (MURPHY; MARTINUK, 1991), a eCG pode induzir a formação de anticorpos anti-eCG dentro de 2 a 4 semanas se o animal receber pelo menos 3 tratamentos na dose de pelo menos 200UI de eCG. Porém, existe grande variação individual sendo que alguns bovinos não apresentam titulações detectáveis de anticorpos anti-eCG mesmo após múltiplos tratamentos (DRION et al., 2001). Isto pode ser motivo de certa preocupação em programas reprodutivos nos quais a eCG é empregada de maneira repetida e em altas dosagens, principalmente em programas de coleta de embrião

por meio de superovulação (MOET) e ovum pick up (OPU). Esta possibilidade do efeito refratário de múltiplas aplicações de eCG ficou evidente em estudos pioneiros realizados por Jainudeen et al. (1966). Estes autores encontraram que animais recebendo doses de 3000UI a cada 6 meses não apresentaram diminuição da resposta ovulatória após o uso de eCG comparado com controles, porém quando o mesmo experimento foi replicado com intervalos menores de 18 a 40 dias entre os tratamentos com eCG, foi verificado o efeito refratário em termos de taxa de ovulação após os múltiplos tratamentos com a eCG.

Outros pesquisadores (BODIN et al., 1997), trabalhando com ovelhas sincronizadas com progetagenos e tratadas com 500 a 550 UI de eCG no final do protocolo, descreveram efeito residual deste tratamento com eCG, sendo possível detectar níveis séricos de anticorpos anti-eCG mesmo um ano depois de sua utilização. Porém, a diminuição na fertilidade ocorreu apenas em pequena parte dos animais (~ 15% das matrizes). De qualquer maneira, até o presente momento, somente é possível encontrar um número limitado de publicações a este respeito em ovinos. Além disso, não foram encontradas na literatura estudos conclusivos sobre os eventuais efeitos negativos de anticorpos anti-eCG na fertilidade de bovinos tratados com eCG durante protocolos de IATF por repetidas vezes e ao longo dos anos em diferentes estações de monta.

2.2.2 Uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em programas reprodutivos para bovinos

Devido sua ação de LH e FSH, a eCG foi inicialmente utilizado em protocolos para superovulação em bovinos (GONZALES et al., 1994). Porém alguns autores observaram que devido à sua grande meia-vida e, portanto, à sua presença em altas concentrações por um longo período de tempo em programas de superovulação, a eCG parece estar associada a presença de folículos anovulatórios (ELSDEN et al., 1978) e a produção de embriões de baixa qualidade (BOLAND et al., 1978; CRITSER et al., 1980). Desta forma, os procedimentos superovulatórios, em geral, passaram a utilizar outros compostos de gonadotrofinas nos programas de superovulação. Porém, recentemente, o uso da eCG em protocolos de

superovulação com ovulação induzida para IATF parecem resultar em taxas similares de produção de embrião se comparado à protocolos utilizando outras gonadotrofinas comerciais (MARTINS et al., 2006).

Mais recentemente, a eCG têm sido incorporado em protocolos para IATF em vacas de corte (CAVALIERI et al., 1997). O tratamento com eCG na dose de 400 UI é altamente recomendado quando uma grande proporção dos animais se encontra em anestro (HUMBLOT et al., 1996; BARUSELLI et al., 2004). Existem muitos relatos de aumentos na fertilidade após a incorporação da eCG em protocolos para IATF, principalmente em vacas de corte (BARUSELLI et al., 2004). A melhora na taxa de concepção em animais que recebem a eCG na retirada do dispositivo intravaginal de P4, provavelmente, está relacionada ao aumento da taxa de ovulação de animais em anestro e aos maiores níveis de progesterona circulante no diestro (BARUSELLI et al., 2004), minimizando falhas no reconhecimento fetal da gestação (MANN; HARESIGN, 2001). Portanto, baseado nos experimentos utilizando administração exógena de estradiol e de eCG em bovinos de corte e leite citados nesta revisão de literatura. As hipóteses são que a suplementação com cipionato de estradiol e eCG no momento da retirada do CIDR aumentarão a concentração circulante de estradiol no pró-estro (efeito do ECP) e progesterona no diestro (efeito da eCG), com consequente aumento na taxa de concepção após a IATF em vacas holandesas de alta produção. Além disso, variações destes protocolos foram testadas em experimentos de dinâmica folicular e de fertilidade a campo de modo a estabelecer um protocolo ideal para vacas de leite de alta produção no Brasil. Para isto foram delineados 5 experimentos que são apresentados nos Capítulos seguintes.

CAPÍTULO I

Efeito da eCG e do ECP na dinâmica folicular e taxa de concepção em vacas de alta produção

1 HIPÓTESE

As principais hipóteses do presente trabalho são: 1) A eCG aumenta o volume do CL formado, a concentração de progesterona circulante no diestro e as taxas de concepção; 2) O tratamento com ECP no momento da retirada do CIDR aumenta a concentração circulante de estradiol no pró-estro e as taxas de concepção; 3) Os dois tratamentos (eCG e ECP) têm efeitos aditivos no aumento da fertilidade após a IATF em vacas Holandesas de alta produção.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da eCG e/ou ECP em protocolos para IATF na concentração de estradiol circulante no proestro, no tamanho do folículo ovulatório, no momento e dispersão das ovulações, no volume do corpo lúteo formado, na concentração plasmática de progesterona no diestro do ciclo estral subsequente à IATF;

- Avaliar em um experimento de fertilidade a campo, o efeito da suplementação com ECP e/ou eCG na taxa de concepção após a IATF em de vacas holandesas de alta produção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANEJO

As unidades experimentais utilizadas foram vacas holandesas em lactação (Dinâmica folicular, n = 96; Teste de fertilidade a campo, n = 782). A média de condição corporal (EDMONSON et al., 1989) dos animais experimentais foi de 2,9 ± 0,01. A média de produção de leite (calculada pela média diária do D0 ao D8 em um subgrupo de animais, n = 533) e de dias em lactação dos animais foi de 36,2 ± 0,4 Kg/dia e 151,6 ± 3,5 dias, respectivamente. O experimento foi efetuado em 22 rebanhos leiteiros sob sistema confinado do tipo *Free-stall* (Figuras 1 a 4), distribuídos nos estados de São Paulo (n = 3), Paraná (n = 18) e Rio Grande do Sul (n = 1) da região Sudeste-Sul do Brasil. O período experimental foi de Dezembro de 2005 a Setembro de 2006. A dieta de todos os animais era constituída, principalmente, de silagem de milho e concentrado de milho e soja. Em todas as fazendas a dieta foi balanceada para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para vacas holandesas em lactação (NRC, 2001). Os procedimentos com os animais foram aprovados pela comissão de ética para experimentação animal da Universidade de São Paulo-USP.

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free-stall*; Fazenda Iguaçu – Céu Azul, Paraná)

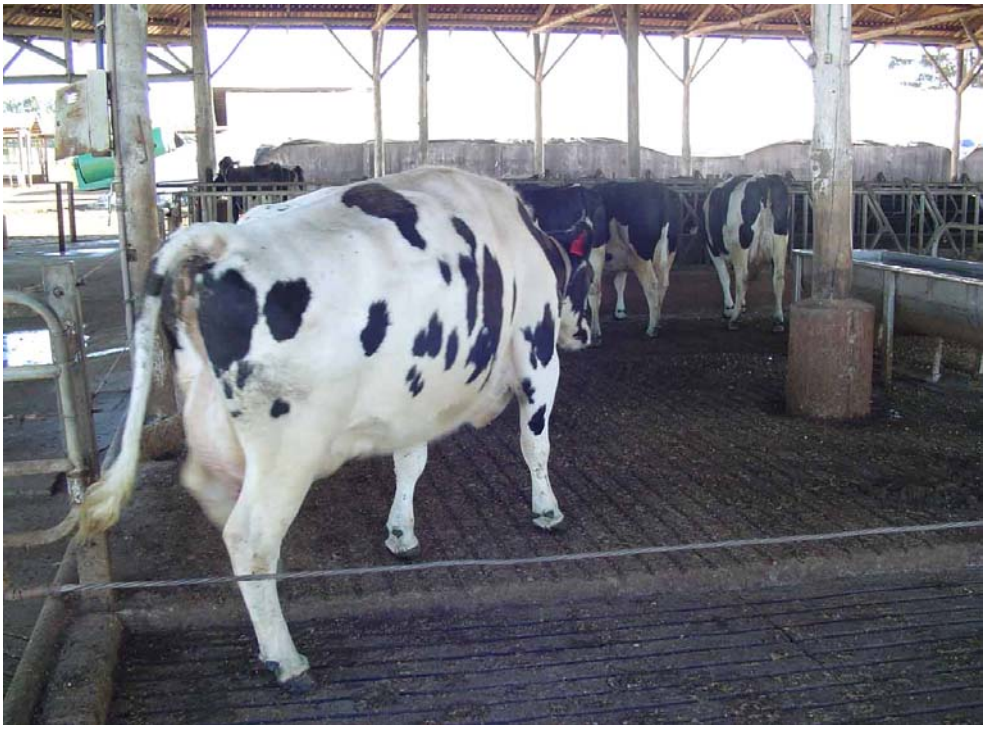


Figura 2 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free-stall*; Agropecuária Randon – Vacaria, Rio Grande do Sul)

Figura 3 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de ordenha*; Fazenda Campestre – São Pedro, São Paulo)

Figura 4 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de espera para ordenha*; Fazenda Santa Rita – Descalvado, São Paulo)

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS

Dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR contendo 1,38 g de P4; Pfizer). Benzoato de estradiol (BE-Estrogin; Pharmavet). Prostaglandina $F2\alpha$ (Lutalyse; Pfizer). Cipionato de estradiol (ECP; Pfizer). GnRH (Fertagyl; Intervet). Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon; Intervet). Todos os tratamentos hormonais exceto o dispositivo intravaginal foram realizados por via intramuscular.

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS

Todos os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) no D0. No dia da retirada do dispositivo de progesterona (D8), todas as vacas receberam um tratamento com PGF2α (Lutalyse). Simultaneamente no D8, os animais foram homogeneamente divididos em 4 grupos: G1) eCG (400UI) + ECP (1 mg) no dia 8; G2) eCG (400 UI) no Dia 8 + GnRH (100 mcg) após 48h; G3) ECP (1 mg) no Dia 8; G4) GnRH (100 mcg) após 48h. A sequência de tratamentos hormonais para todos os grupos experimentais estão representados na figura 5.

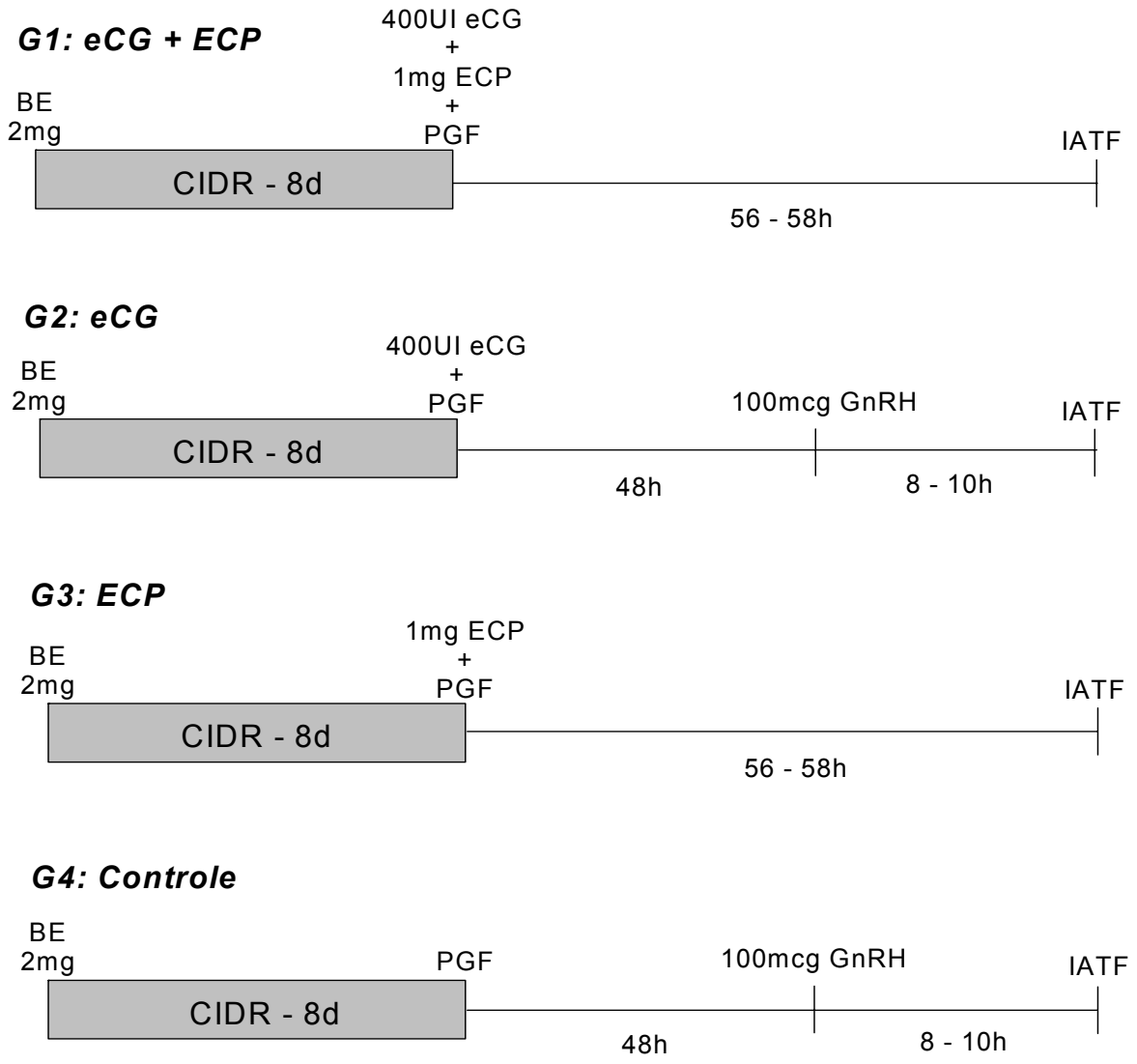


Figura 5 - Representação esquemática dos grupos experimentais

3.4 FASE 1 - DINÂMICA FOLICULAR

Durante a fase de avaliação da dinâmica folicular, realizaram-se exames ultra-sonográficos e coletas de sangue a cada 24h da inserção (D0) até a retirada (D8) do dispositivo intravaginal em 45 animais. Foi utilizado um transdutor linear de 6.0/8.0 Mhz associado ao recurso “cineloop” para mensurar o tamanho das estruturas ovarianas (Falco 100, Pie Medical Equipment B.V., Maastricht, Holland). Todos os

animais foram examinados a cada 12h até o momento da ovulação ou até 96h da retirada do CIDR. Nos animais em que a ovulação foi verificada, os exames ultra-sonográficos e as coletas de sangue ocorreram a cada dois ou três dias por 21 dias após a IATF. O volume do CL foi calculado com a seguinte fórmula: $V = 4/3 \times \pi \times R^3$; utilizando-se o raio médio (R) calculado pela formula $R = (D_a/2 + D_b/2)/2$, onde D_a e D_b são os diâmetros perpendiculares do CL mensurados em uma imagem ultra-sonográfica congelada do maior diâmetro do CL. O volume da cavidade do CL, caso existente, foi calculado com a mesma metodologia e subtraído do volume total do CL.

Um segundo subgrupo de animais (n = 51) foi examinado por ultra-sonografia a cada 12h até o momento da ovulação ou até 96h da retirada do CIDR. Além disso, neste segundo subgrupo de animais, amostras de sangue foram coletadas a cada 4 horas de 30 a 58h da retirada do implante intra-vaginal para se verificar o momento do pico de LH. O comportamento de estro foi verificado por observação visual com o auxílio de um dispositivo para detecção de comportamento de aceitação de monta (Kamar®; Kamar Inc., Steamboat Springs, CO; Figura 6) a cada 4h a partir da retirada do CIDR até 96h em todos os animais na fase de dinâmica folicular.

Figura 6 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Kamar®* - dispositivo que auxiliou na detecção de cio. Este dispositivo muda sua coloração para vermelho quando o animal aceita a monta)

3.5 FASE 2 - TESTE DE FERTILIDADE A CAMPO

Durante o teste de fertilidade a campo, os animais (n = 782) receberam os mesmos protocolos hormonais descritos na figura 1. O sêmen de vários touros foram utilizados e balanceados de forma similar entre os grupos experimentais. O diagnóstico de concepção foi realizado por exame ultra-sonográfico aos 33 dias após a IATF.

3.6 DOSAGENS HORMONAIS

As amostras de sangue foram coletadas na veia caudal, centrifugadas a 1600 x g por 20 minutos e as amostras de soro foram imediatamente acondicionadas em temperaturas de - 20°C até o momento da análise hormonal para progesterona (P4) e hormônio luteinizante (LH). A progesterona circulante foi avaliada utilizando o kit para P4-RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Os valores do CV intra- e inter-ensaio foram 4,3% e 0,6%, respectivamente. As concentrações circulantes de LH foram determinadas por radio-imuno-ensaio como previamente descrito (BOLT et al., 1990). Os valores do CV intra e inter-ensaio foram 2,3% e 3,6%, respectivamente. O pico de LH foi definido como um aumento das concentrações circulantes maiores que 2 desvios padrões acima da média geral das concentrações de LH durante o período de coleta. O estradiol circulante foi medido por eletro-químio-luminescência (Kit estradiol – Elecsys 1010). As amostras de soro foram extraídas com dietil éter e concentradas em 10 vezes. Os valores do CV intra-ensaio foi 12,0%. Dois controles (de 100 e 500 pg/mL) foram diluídos em soro humano e em soro bovino. Ocorreu um paralelismo entre as dosagens dos controles nos diferentes tipos de soros (humano x bovino), conforme descrito na figura 7.

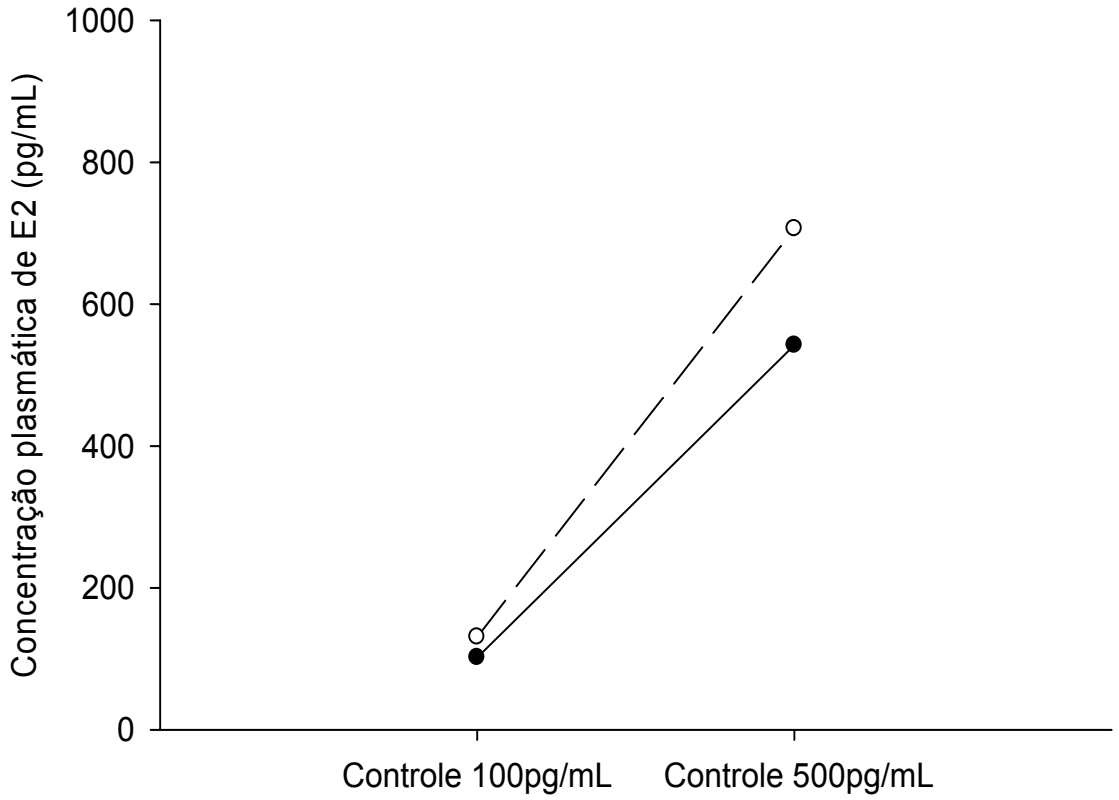


Figura 7 - Dosagem de estradiol em 2 soros controles (de 100 e 500 pg/mL) em soro humano (linha contínua) e soro bovino (linha pontilhada). Coeficiente de correlação = 1

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

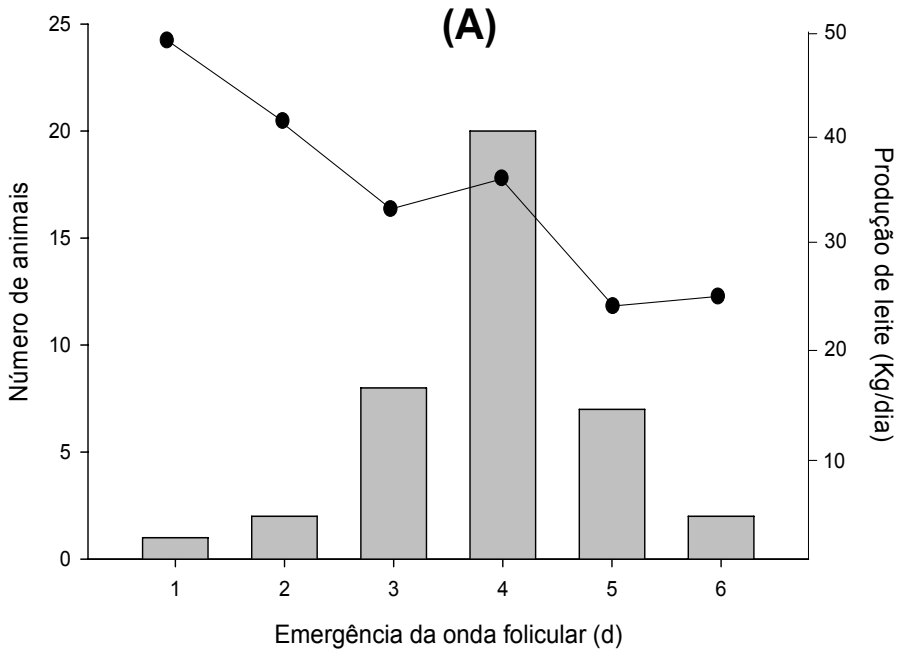
Para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o proc MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). A unidade experimental "vaca" foi o objeto das medidas repetidas ao longo do tempo e a estrutura matricial do tipo POW foi utilizada devido aos diferentes intervalos nos momentos de coleta de sangue. Os dados binomiais foram analizados com o proc GLIMMIX do SAS (Version 9,1 for Windows; SAS Inst., Cary, NC), e a unidade experimental "vaca" foi incluída no modelo estatístico como variável de efeito aleatório. As informações de época do ano, fazenda, dias em lactação, ordem de parição, condição corporal, presença de CL no dia da inserção do implante e produção de leite, assim como as interações, foram utilizadas nos

modelos estatísticos. No modelo de regressão logística final foram removidas as variáveis por eliminação do tipo backward baseado no critério de Wald para $P > 0,20$. As correlações entre variáveis foram analisadas com o proc CORR do SAS. O teste de Bartlett foi utilizado para testar diferença na variância do momento do pico de LH e ovulação entre os grupos. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências. Todos os dados estão expressos como medias ± erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 DINÂMICA FOLICULAR

A associação de CIDR e 2,0mg de BE foi eficaz em causar a emergência sincronizada (2 a 5 dias) de uma nova onda folicular em aproximadamente 85% dos animais (38/45). O momento da emergência da onda folicular não diferiu entre os grupos ($P > 0,10$) e ocorreu aos 3,9 ± 0,2 dias após a inserção do dispositivo de P4. Porém, foi observada uma correlação negativa entre o nível de produção de leite e o dia da emergência folicular ($r = -0,40$; $P < 0,05$) após o tratamento com BE e CIDR (Figura 8), sendo que os animais de maior produção de leite apresentaram emergência folicular mais precoce ($P < 0,05$) se comparado com vacas de menor produção de leite.



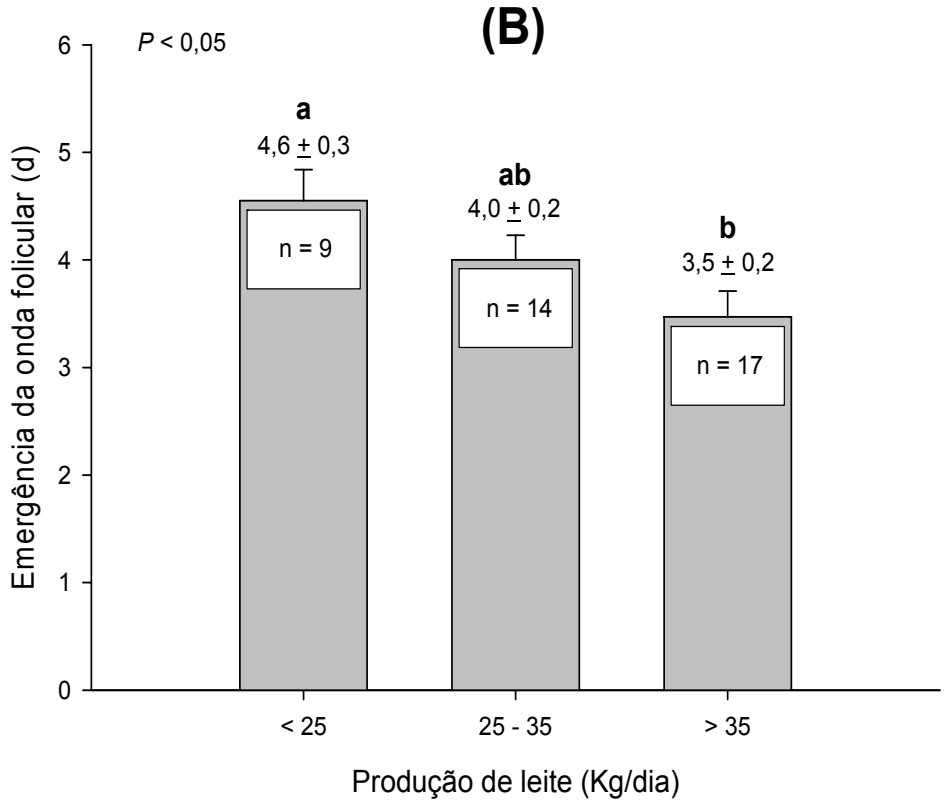


Figura 8 - A) Dia da emergência folicular (média ± erro padrão da média) após a retirada do dispositivo de P4 (colunas) e média de produção de leite conforme o momento da emergência folicular (●). B) Momento da emergência folicular após a inserção do CIDR conforme a classe de produção de leite (Kg/dia)

Apesar da utilização de diferentes indutores de ovulação (cipionato de estradiol vs. GnRH) no final do protocolo hormonal, a concentração plasmática de LH nas amostras de sangue coletadas a cada 4 horas (30h a 58h após a retirada do CIDR) indicou de que não houve diferença nas características da amplitude e área da curva de liberação de LH pré-ovulatório entre os grupos experimentais (Tabela 1). Porém, apesar do momento das ovulações não ter sido diferentes, a dispersão do momento do pico de LH foi maior nos animais que receberam ECP como indutor ovulatório. Neste sentido, quando mais animais foram adicionados (Tabela 2) na comparação do momento e variação das ovulações, ficou evidente que o tratamento com ECP aumenta a variabilidade do momento das ovulações, concordando com os dados de maior variação do momento do pico de LH.

Tabela 1 - Características (média ± erro padrão da média) do pico de LH pré-ovulatório e do momento da ovulação conforme o grupo experimental

Tratamento		Pico de LH não detectado (n)	Momento do pico de LH (h)	Amplitude do pico de LH (ng)	Área sob a Curva de LH (ng^2)	Momento da ovulação (h)
eCG + ECP		3/10	44,3 ± 3,4	16,2 ± 3,8	27,4 ± 3,4	69,0 ± 3,9
eCG		1/10	42,4 ± 2,4	15,0 ± 2,5	30,1 ± 2,8	67,5 ± 2,4
ECP		2/10	42,0 ± 4,1	12,9 ± 2,9	27,2 ± 4,3	71,3 ± 4,3
Controle		1/10	45,5 ± 2,7	12,1 ± 1,3	24,2 ± 1,6	69,0 ± 3,4
Contrastes ortogonais						
Com ECP		5/20	43,1 ± 2,6 [x]	14,5 ± 2,4	27,3 ± 2,7	70,2 ± 2,8
Sem ECP		2/20	43,9 ± 1,8 [y]	13,6 ± 1,5	27,3 ± 1,8	68,3 ± 2,0
	Com eCG	4/20	43,3 ± 1,9	15,5 ± 2,1	29,0 ± 2,3	68,3 ± 2,2
	Sem eCG	3/20	43,9 ± 2,3	12,5 ± 1,5	25,6 ± 2,1	70,2 ± 2,7

[x,y] Desvios padrão diferem estatisticamente; $P < 0.05$.

O tratamento com 1 mg de ECP aumentou (24h) ou tendeu a aumentar (48h) as concentrações circulantes de estradiol após a retirada do dispositivo intravaginal comparado aos animais que não receberam suplementação de estradiol. Porém, o tratamento com eCG não afetou as concentrações circulantes de estradiol no período pré-ovulatório (Figura 9).

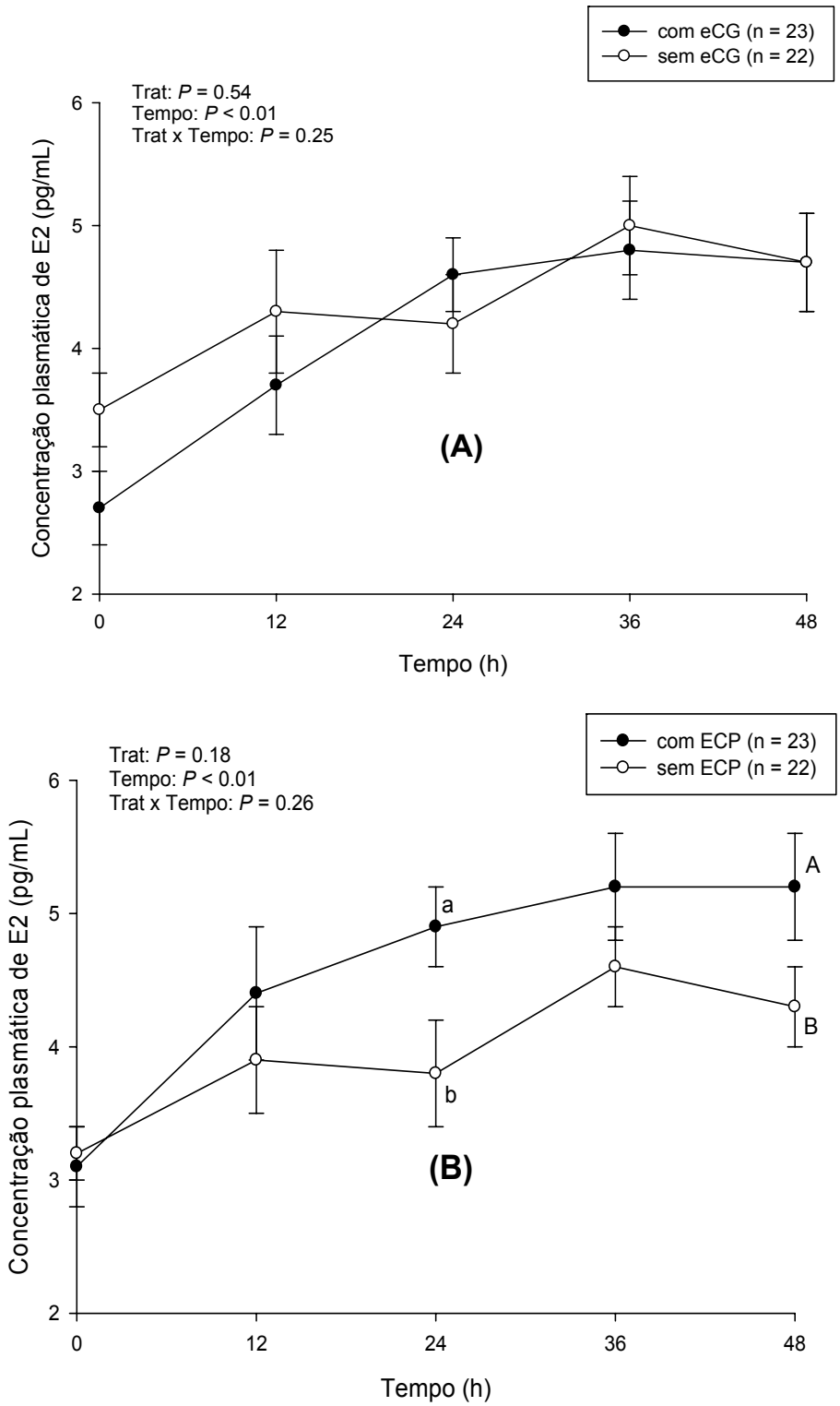


Figura 9 - Efeito (média ± erro padrão da média) da eCG (A) e do ECP (B) na concentração plasmática de estradiol desde o momento da retirada do CIDR (0h) até o momento da aplicação de GnRH (48h) em vacas de leite de alta produção. As aplicações de eCG e ECP ocorreram no momento da retirada do CIDR conforme o grupo experimental. ^{a,b} P < 0,05; ^{A,B} P < 0,10

Após combinar os subgrupos de animais em uma tabela para análise da dinâmica folicular próximo ao momento da ovulação (Tabela 2), foi verificado que o tratamento com eCG não afetou a porcentagem de animais apresentando comportamento de estro antes de 48h após a retirada do dispositivo de progesterona, o momento e a dispersão das ovulações, o tamanho do folículo dominante 48h após a retirada do CIDR e a porcentagem de animais que apresentaram duplas ovulações (Tabela 2). Não houve efeito do tratamento com ECP no tamanho do folículo ovulatório, no momento da ovulação, na porcentagem de animais com duplas ovulações. Porém, a tabela de dinâmica folicular final indica que os animais que receberam ECP como indutor ovulatório apresentaram maior variação no momento das ovulações se comparado aos animais que não receberam ECP (Tabela 2 e Figura 11). Por outro lado, o tratamento com ECP no momento da retirada do CIDR aumentou a porcentagem de animais que apresentam comportamento de estro antecipado (< 48h após a retirada do CIDR). Os animais que apresentaram comportamento de estro precoce ovularam, em média, cerca de 12h antes e com maior variação se comparado com animais que não mostraram cio antecipado (63,3 ± 2,1h vs. 75,7 ± 1,2h; Figura 10).

Tabela 2 - Proporção de vacas que apresentaram cio antes de 48h após a retirada do CIDR, taxa de ovulação, diâmetro (média ± erro padrão da média) do folículo dominante (cm) 48h após a retirada do CIDR, momento da ovulação (h) após a retirada do CIDR (média ± erro padrão da média), e porcentagem de duplas ovulações

	n	Cio < 48h (%)	TX OVUL (%)	∅ FD (cm)	MOM. OVUL. (h)	DUPLA OVUL. (%)
eCG + ECP	25	32,0	84,0	1,36 ± 0,04	70,2 ± 2,9	12,0
eCG	24	12,5	79,2	1,47 ± 0,06	72,9 ± 2,1	12,5
ECP	24	20,8	87,5	1,43 ± 0,05	75,1 ± 2,7	20,8
Controle	23	8,7	82,6	1,31 ± 0,06	74,8 ± 2,2	21,7
Contrastes ortogonais						
Com ECP	49	26,5 [a]	85,7	1,40 ± 0,03	72,7 ± 2,0 [x]	16,3
Sem ECP	47	10,6 [b]	80,9	1,39 ± 0,05	73,9 ± 1,5 [y]	17,0
Com eCG	49	22,4	81,6	1,42 ± 0,04	71,5 ± 1,8	12,2
Sem eCG	47	14,9	85,1	1,37 ± 0,04	75,0 ± 1,8	21,3

[a,b] Médias diferem estatisticamente; P < 0,05.
[x,y] Desvios padrão diferem estatisticamente; P < 0,05.

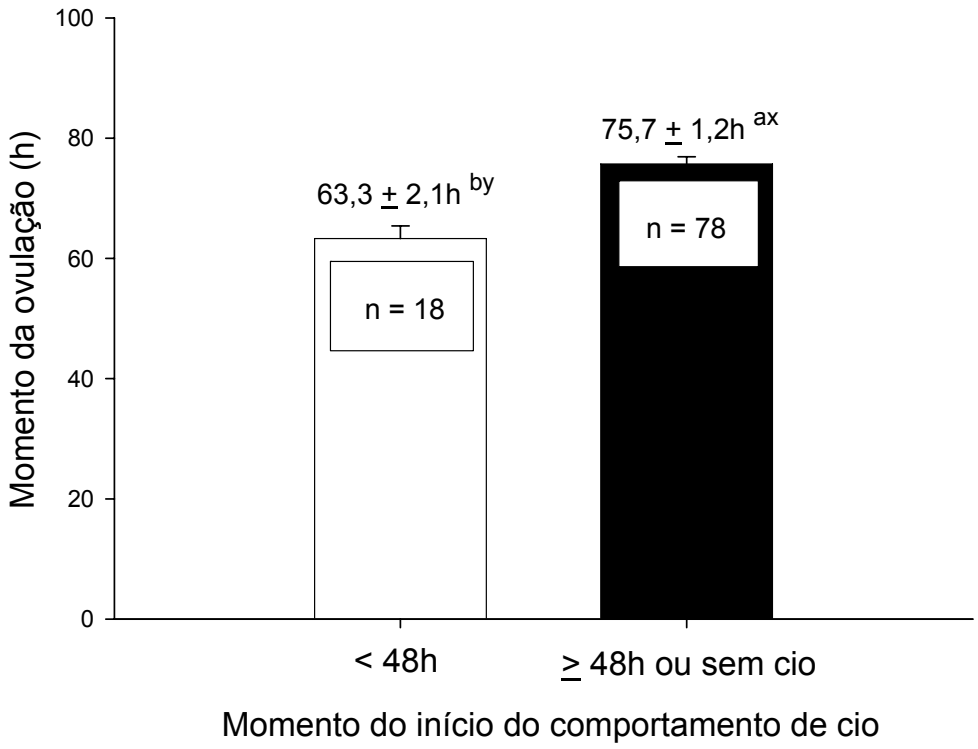


Figura 10 - Momento da ovulação (média ± erro padrão da média) após a retirada do CIDR em animais que apresentaram o comportamento de estro (aceitação de monta) < 48h ou ≥ 48h e que não apresentaram cio. O comportamento de estro foi verificado por observação visual com o auxílio de um dispositivo para detecção de comportamento de aceitação de monta (Kamar®; Kamar Inc., Steamboat Springs, CO) a cada 4h a partir da retirada do CIDR até 96h. [a,b] médias diferem estatisticamente, P < 0,05; [x,y] desvios padrões diferem estatisticamente, P < 0,05

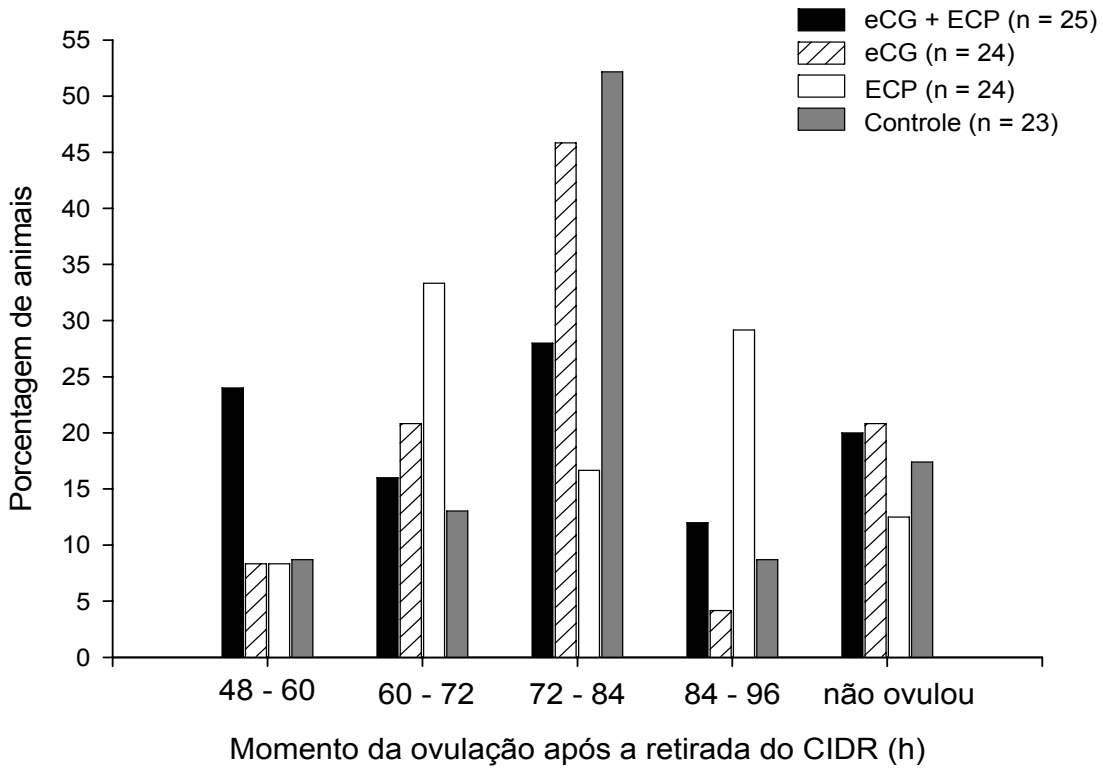
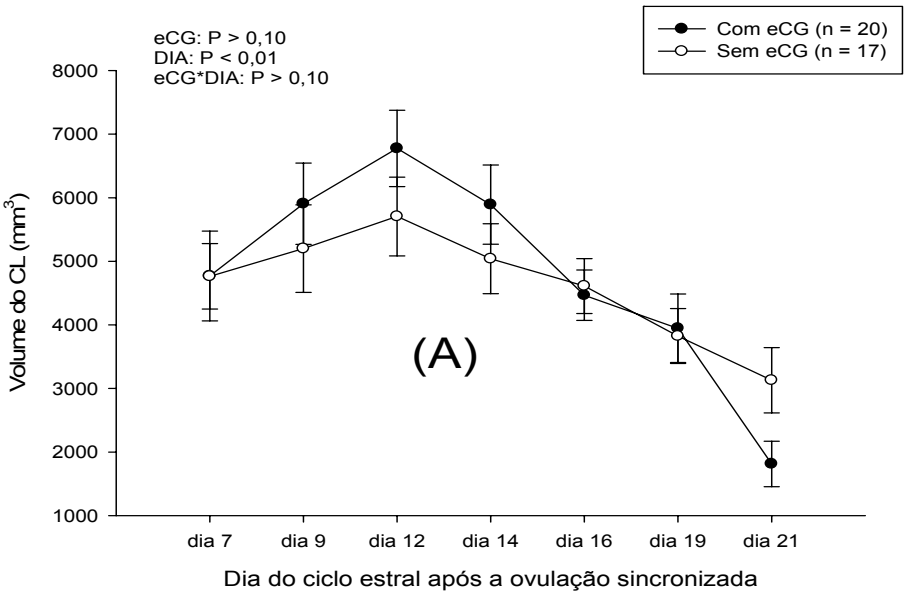


Figura 11 - Distribuição do momento (h) da ovulação após a retirada do CIDR conforme o grupo experimental

No ciclo estral subsequente à IATF, apesar da aparente diferença numérica, o tratamento com eCG não aumentou significativamente o volume do CL formado após a ovulação sincronizada ($P > 0,10$). Porém, as concentrações circulantes de P4 foram maiores (D12, $P < 0,05$) e tenderam a serem maiores (D14, $P < 0,10$) em determinados dias do ciclo estral nos animais que receberam eCG (Figura 12).



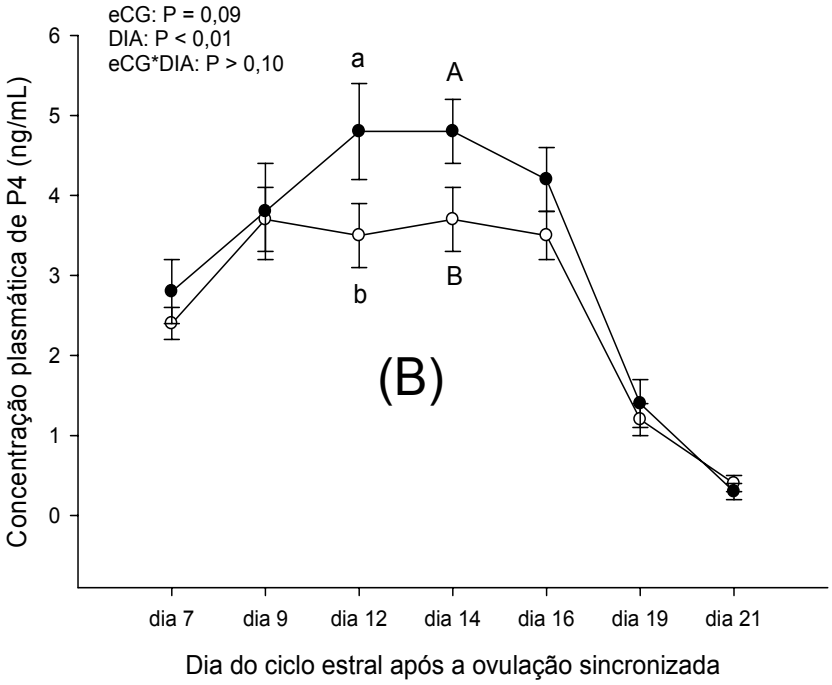


Figura 12 - Efeito (média ± erro padrão da média) da eCG no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral subsequente ao uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção. ^{a,b} P < 0,05; ^{A,B} P < 0,10

Aparentemente, apesar da maior variação dos momentos de ovulação verificada após o uso de ECP no momento da retirada do dispositivo, isto não afetou

o volume e a capacidade esteroidogênica do CL formado após a ovulação sincronizada (Figura 13).

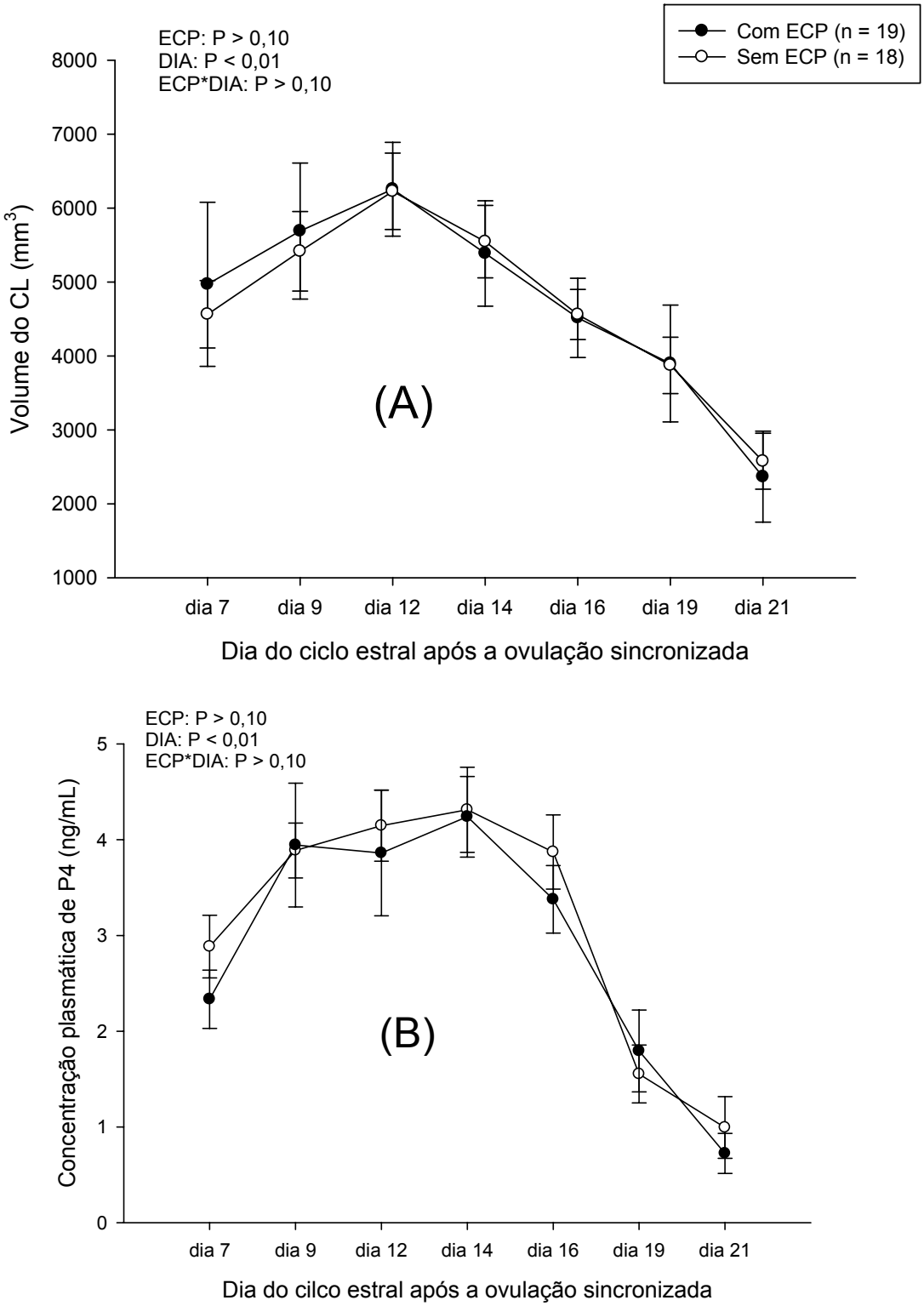


Figura 13 - Efeito (média ± erro padrão da média) do ECP no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral subsequente ao uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção

Um resultado inesperado encontrado no presente experimento foi o efeito da condição corporal no volume e nas concentrações circulantes de progesterona. Os animais foram classificados em duas classes de condição corporal (< 2,75 ou ≥ 2,75) baseado nos dados de estudos recentes (MOREIRA et al., 2000; GALVAO et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Tais investigações encontraram menor taxa de concepção em vacas de leite de alta produção com condição corporal menor que 2,75. Foi verificado que o escore de condição corporal dos animais afetou o volume ($P < 0,05$) e as concentrações plasmáticas de progesterona ($P = 0,08$) no diestro subsequente à IATF. Ficou evidente que animais de baixa condição corporal (< 2,75) apresentaram menor volume e concentrações de P4 circulantes nos dias 12 e 14 do ciclo estral (Figura 14) se comparado com animais de maior (≥ 2,75) condição corporal.

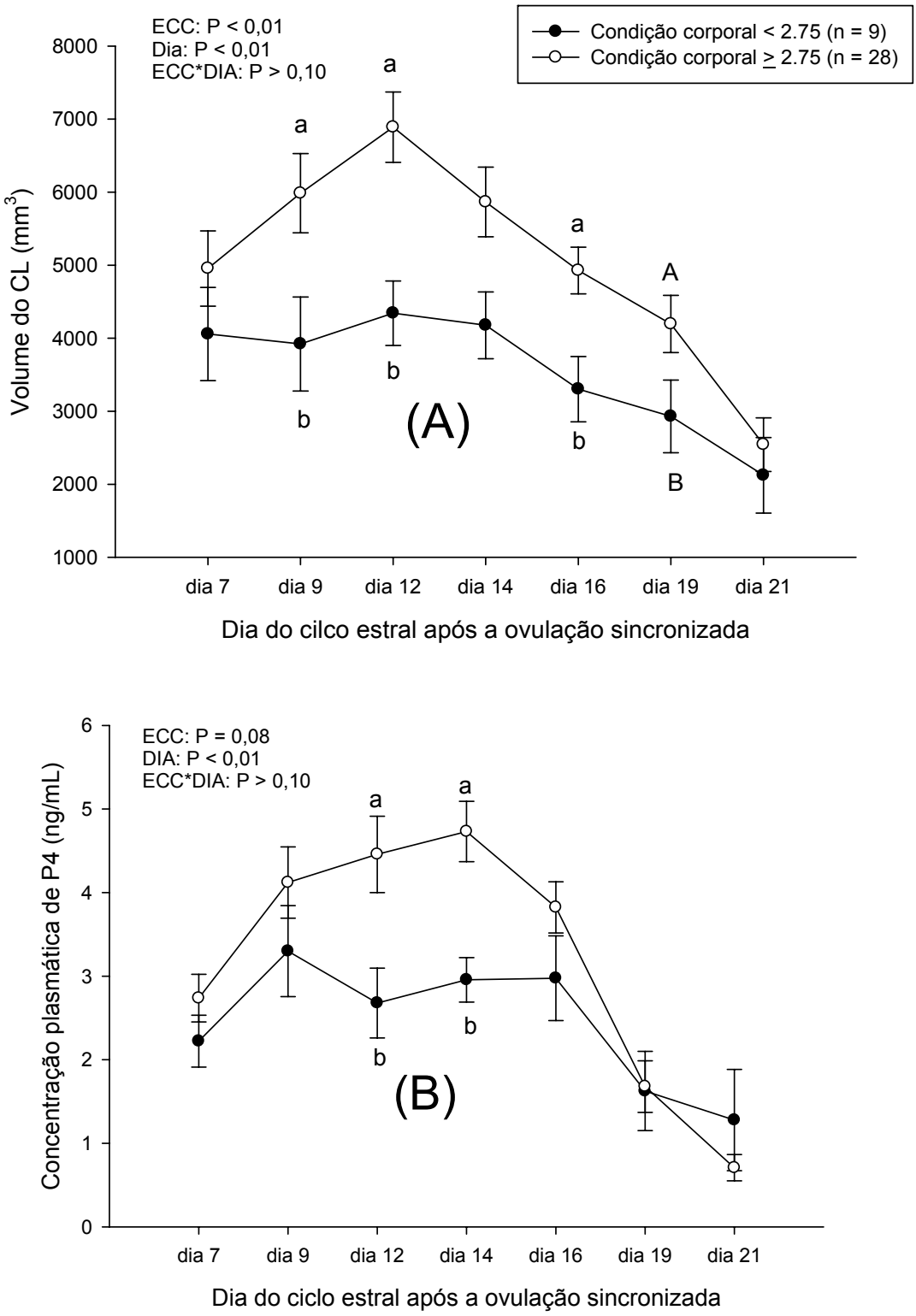


Figura 14 - Efeito (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (ECC, escala de 1 a 5; Edmonson et al., 1989) no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) durante o ciclo estral após o uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção. [a,b] P < 0,05; [A,B] P < 0,10

4.2 TESTE DE FERTILIDADE A CAMPO

A tabela 3 mostra a taxa de concepção em todas as fazendas participantes do experimento de acordo com a época do ano. Independente da época do ano, foi detectada uma correlação negativa entre a porcentagem de animais com escore corporal baixo e taxa de conepção ($r = - 0,22$; $P < 0,05$). Os resultados de campo apresentados na tabela 4 são indicativos que os animais no Grupo 2 apresentaram taxas de concepção maiores que os animais do grupo Controle (33,8% vs. 28,9%; $P < 0,05$).

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 33 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção de acordo com a fazenda, época do ano e porcentagem de vacas com baixo escore corporal (ECC). As fazendas que participaram do experimento na fase de verão não foram as mesmas que participaram do experimento na fase de inverno

FAZENDA	ÉPOCA*	n	VACAS COM BAIXO ECC** (%)	TC*** (%)
1	V	17	35,3	41,2
2	V	12	25,0	25,0
3	V	24	37,5	50,0
4	V	28	25,0	14,3
5	V	26	38,5	19,2
6	V	9	44,4	22,2
7	V	10	50,0	10,0
8	V	55	22,6	27,3
9	V	20	35,0	45,0
10	V	26	26,9	26,9
11	V	36	13,9	41,7
12	V	10	20,0	20,0
13	V	20	25,0	30,0
14	V	36	19,4	25,0
15	V	20	10,0	35,0
16	V	39	35,9	20,5
17	I	37	21,6	43,2
18	I	156	25,0	39,7
19	I	16	14,3	43,8
20	I	151	26,5	21,9
21	I	27	4,0	22,2
22	I	7	22,0	57,1

* Época = verão (V) ou inverno (I).
** ECC = escore de condição corporal (Edmonson et al., 1989).
***TC = taxa de concepção (número de animais conceberam/número total de IAs).

Tabela 4 - Taxa de concepção aos 33 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção

Tratamento		ECC*	n	TC** (%)
ECP + eCG		2,86 ± 0,02	196	29,1 [ab]
eCG		2,87 ± 0,02	198	33,8 [a]
ECP		2,89 ± 0,02	194	30,9 [ab]
Controle		2,89 ± 0,02	194	28,9 [b]
	Contrastes ortogonais			
Com ECP		2,87 ± 0,02	390	30,0
Sem ECP		2,88 ± 0,01	392	31,4
	Com eCG	2,87 ± 0,02	394	31,5
	Sem eCG	2,89 ± 0,02	388	29,9

* ECC = escore de condição corporal (Edmonson et al., 1989).
**TC = taxa de concepção (número de animais conceberam/número total de IAs).
[a,b] Médias diferem estatisticamente; P < 0,05.

Em geral, a taxa global de concepção foi afetada pelo local (Fazenda), escore de condição corporal e dias em lactação dos animais (P < 0,05). A presença de CL no início do protocolo de sincronização, número de partos, dias em lactação e produção de leite não afetaram (P > 0,10) a taxa de concepção. Os dados são indicativos de que o uso de eCG no grupo 2 aumentou a taxa de concepção de animais de menor condição corporal comparado ao grupo Controle (Figura 7). Os animais dos Grupos 1 e 3 apresentaram taxas de concepção intermediárias (Tabela 3); porém, para ambos os grupos, os animais de menor condição corporal apresentaram maiores taxas de concepção se comparados a animais de menor condição corporal no grupo Controle (Figura 15). No entanto, os contrastes ortogonais apresentados na tabela 3 não indicaram efeitos significativos da adição de ECP ou eCG nas taxas de concepção.

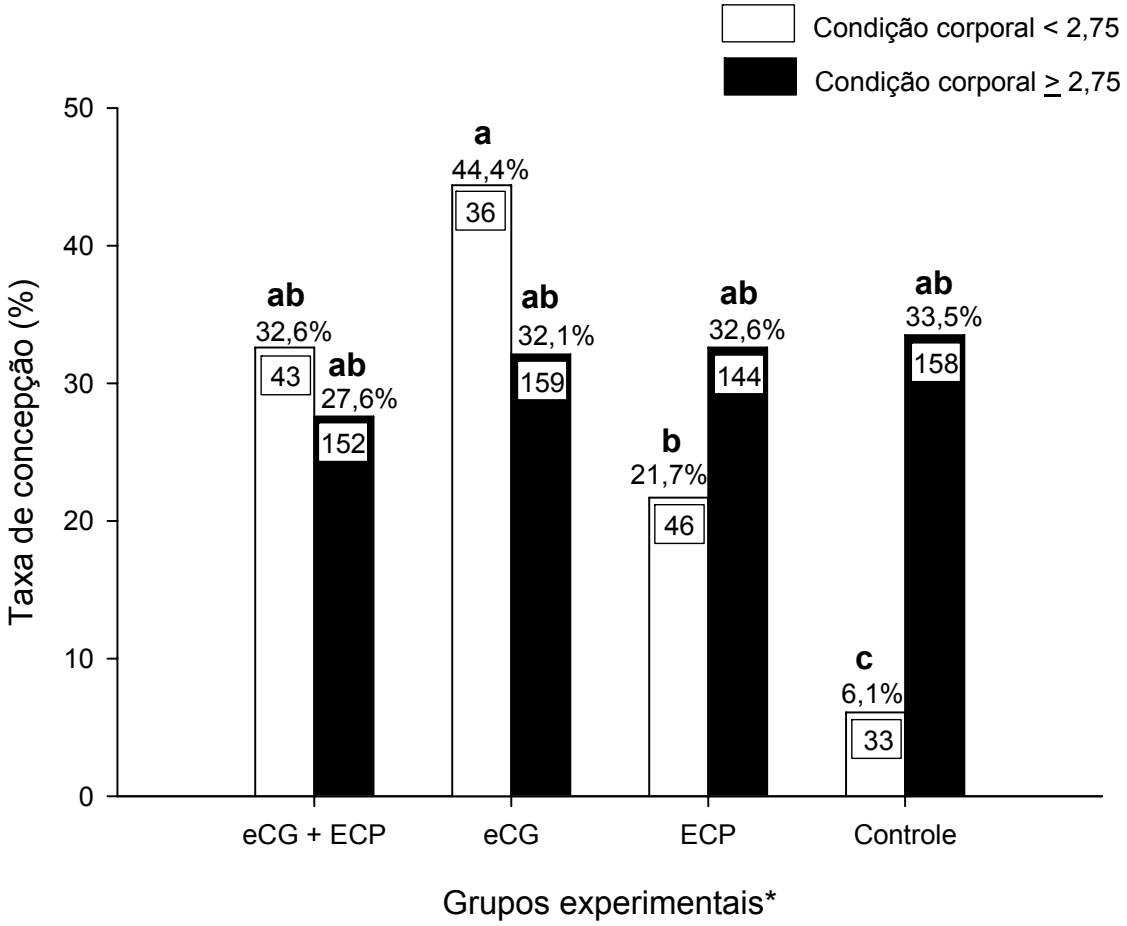


Figura 15 - Taxa de concepção para animais de condição corporal < 2,75 e ≥ 2,75 (escala de 1 a 5) conforme o grupo experimental. Letras diferentes entre colunas diferem estatisticamente; P < 0,05.* O escore de condição corporal foi coletado de um subgrupo de animais (n = 771)

Apesar do tratamento com ECP (G3) ter aumentado as taxas de concepção em animais de condição corporal < 2,75 comparado ao grupo Controle (G4), os efeitos da utilização da eCG em animais de menor escore corporal parecem ser mais acentuados que a utilização somente do ECP. Porém, ao contrário do esperado, o uso da eCG associado ao ECP não apresentou efeito aditivo na taxa de concepção, nem mesmo em animais de baixo escore corporal.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram que o uso intenso de exames ultra-sonográficos não altera a expressão de estro, liberação de LH e ovulação (ROELOFS et al., 2004), sendo assim os animais presentes nos subgrupos envolvidos em exames ultra-sonográficos frequentes (fase 1 - dinâmica folicular), provavelmente, refletem de maneira real o que aconteceu em termos de dinâmica folicular nos animais que não receberam exames ultra-sonográficos mais intenso (fase 2 - teste de fertilidade a campo).

Os resultados apresentados na figura 8 mostram que existe uma correlação negativa entre o nível de produção de leite e o dia da emergência folicular após o tratamento com 2,0mg de BE associado ao CIDR. Burke et al. (2003), trabalhando com 4 dosagens de benzoato de estradiol (0, 1, 2, 4 mg de BE) associados a dispositivos intravaginais contendo progesterona, observaram que o dia da emergência folicular em protocolos que associam dispositivos de P4 pode ser atrasado com o uso de maiores doses de estradiol no dia da inserção do implante. Ainda, estes pesquisadores observaram que o momento da emergência de uma nova onda de crescimento folicular parece depender do clearance do estradiol da circulação, pois a emergência folicular somente ocorreu quando as concentrações de estradiol no sangue estavam baixas. Sangsritavong et al. (2002) encontraram maiores taxas de metabolização hepática de hormônios esteróides em animais de alta produção. Portanto, no presente estudo, provavelmente, os animais de mais alta produção leiteira metabolizaram mais rapidamente o estradiol exógeno, o que desencadeou a emergência folicular mais antecipada nos animais de maior produção. Portanto, os achados do presente estudo indicam que doses maiores de estradiol devam ser utilizadas em animais de mais alta produção (~ 35 Kg/dia ou maior) de modo a atrasar o aparecimento de uma nova onda folicular e, eventualmente, melhorar a eficiência da regressão de folículos dominantes presentes no dia da inserção do dispositivo intravaginal, evitando a formação de possíveis folículos persistentes (AHMAD et al., 1995).

O momento do pico de LH não diferiu entre os grupos e ocorreu em média 43,6 ± 1,5h após a retirada do CIDR. Em consequência, apesar dos indutores de ovulação ser diferentes entre os grupos 1 e 3 vs. 2 e 4, os momentos de ovulação

para os diferentes grupos experimentais foram similares (média geral = 73,7 ± 1,1h após a retirada do CIDR, n = 96). Os intervalos entre o pico de LH e ovulação estão de acordo com publicações recentes (ROELOFS et al., 2004), que relatam o tempo entre o pico de LH e ovulação de 25,3 ± 0,6 h. Colazo et al. (2003) demonstraram em uma série de 4 experimentos, utilizando novilhas de corte, que o ECP pode ser utilizado no momento da retirada do dispositivo de progesterona de modo a causar uma sincronia das ovulações que se equipara à utilização do benzoato de estradiol 24h após a retirada do dispositivo. Porém, os dados do presente experimento indicam que os animais que recebam ECP como indutor ovulatório apresentaram maior variação no momento do pico de LH e da ovulação após a retirada do CIDR se comparado com os animais que receberam GnRH como indutor de ovulação. Porém, esta variação no momento do pico de LH não foi detectada quanto comparamos o momento de da ovulação após a retirada do dispositivo de progesterona, provavelmente, devido às diferenças nos intervalos de coleta de sangue para dosagem de LH (intervalos de 4h) e os intervalos entre exames ultra-sonográficos para detecção da ovulação (intervalos de 12h). Eventualmente, a variação no momento do pico de LH e ovulação pode ter sido uma das causas da ausência do efeito aditivo no aumento das taxas de concepção quando a eCG e o ECP foram utilizados no mesmo protocolo (Grupo 1), pois a inseminação pode ter sido efetuada muito antecipadamente ou tardiamente em alguns animais nos grupos 1 e 3. Uma das causas desta grande variação no momento da ovulação pode ser devido à variação no nível de produção de leite e consequente variação no nível de metabolismo de esteróides entre os animais que foram utilizados neste experimento.

A utilização de eCG não aumentou o tamanho do folículo ovulatório e a concentração circulante de estradiol 48h após a retirada do CIDR. Estes achados estão de acordo com experimentos anteriores realizados em bovinos de corte (BARUSELLI et al., 2004) e em bovinos de leite (VENERANDA et al., 2006). Por exemplo, Veneranda et al. (2006), trabalhando com vacas holandesas suplementadas ou não com 400UI de eCG no final do tratamento com dispositivo de P4, verificaram que o tamanho do folículo ovulatório foi similar entre animais que receberam (15,0 ± 0,7 mm) ou não eCG (16,2 ± 0,7 mm). Porém, outros autores relataram aumentos nos tamanhos do folículo ovulatório após o tratamento com eCG em bovinos de corte em anestro (SÁ FILHO et al., 2004; MARAÑA et al., 2006). Essa diferença entre os experimentos pode ser devido à quantidade de LH

endógeno liberado durante os tratamentos hormais. Vacas de corte em anestro apresentam comprometimento na pulsatilidade de LH (WILTBANK et al., 2002). Assim, o tratamento com eCG poderia atuar efetivamente aumentando o crescimento folicular e o tamanho do folículo ovulatório neste grupo de animais. Vacas de leite apresentam menor incidência de anestro pós-parto associado com a presença de folículos pequenos que vacas de corte (WILTBANK et al., 2000), motivo pelo qual, provavelmente, não se verificou efeito positivo do tratamento com eCG no diâmetro do folículo ovulatório no presente experimento.

A adição de ECP no protocolo hormonal causou aumento na porcentagem de animais apresentando comportamento de estro dentro de 48h após a retirada do CIDR. Além disso, os animais apresentando cio antes de 48h após a retirada do CIDR ovularam cerca de 12h antes e com maior variação no momento da ovulação se comparado aos animais que não apresentaram cio antes de 48h. Estes dados podem ser de grande importância aplicada, sendo que os animais que apresentam cio antecipado, provavelmente devam ser inseminados antecipadamente (por exemplo, 12h após a manifestação de cio).

A condição corporal afetou ($P < 0,05$) as taxas de concepção no grupo Controle. Estes dados estão de acordo com outras publicações em vacas de leite de alta produção submetidas a protocolos de IATF (SOUZA et al., 2007). Além disso, na maioria destes experimentos, a taxa de concepção parece ser menor quando os animais apresentam escore de condição corporal menor que 2,75 (MOREIRA et al., 2000; GALVAO et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Apesar disso, nos grupos experimentais tratados com eCG e/ou ECP a taxa de concepção entre animais de menor e maior condição corporal não foram diferentes (Figura15). Aparentemente, ambos eCG e ECP aumentaram as taxas de concepção em animais de baixa condição corporal. Porém, os animais de menor ECC tratados somente com eCG no final do protocolo hormonal (Grupo 2) apresentaram taxas de concepção maiores que os animais de menor ECC que receberam somente o éster de estradiol (Grupo 3). Estes achados estão de acordo com alguns experimentos realizados na América do sul em vacas holandesas em sistemas de pastejo (VENERANDA et al., 2006; BÓ et al., 2007). No estudo realizado por Veneranda et al. (2006), também foi verificado que animais suplementados com eCG (Experimento 2), em um esquema de tratamentos hormonais similares aos utilizados no presente experimento, apresentaram maiores taxas de concepção (44,9%) se comparado ao grupo sem

suplementação com eCG (30,0%). Porém, em um experimento seguinte, este mesmo autor (VENERANDA et al., 2006 - Experimento 3) não verificou, apesar da diferença numérica, aumentos significativos nas taxas de concepção de animais tratados com eCG (52,0%) comparado ao grupo controle (41,0%). Estes dados contraditórios podem ser devido às eventuais diferentes porcentagens de animais com baixo escore corporal presentes nos dois experimentos.

Provavelmente, o mecanismo fisiológico que causou aumento na taxa de concepção em animais de menor ECC é diferente após o uso da eCG e ECP. O transporte espermático através do trato reprodutivo feminino é fundalmentalmente dependente da motilidade do trato (HAWK, 1987). Foi demonstrado que o estradiol pode alterar a motilidade do trato reprodutivo (HAWK et al., 1975a). No mesmo estudo, estes pesquisadores observaram que o tratamento com estradiol pode aumentar não somente o número de contrações uterinas, como também o número de contrações em direção ao oviduto, o que poderia favorecer ainda mais o transporte espermático para o local da fertilização. Hawk et al. (1975b) relataram que a suplementação com estradiol foi benéfica para o transporte espermático no trato uterino de ovelhas. Neste estudo, a administração de pequenas doses de estradiol-17β duplicou o número de espermatozóides que alcançaram a cérvix, e aumentou em oito vezes o número de espermatozóides que alcançaram o oviduto. Outros autores encontraram efeitos positivos de maiores níveis de estradiol na fertilidade (GADDUM-ROSSE et al., 1981; ORIHUELA et al., 1999, LOPES et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a suplementação com estradiol antes da primeira ovulação no pós-parto é capaz de estender a fase luteínica e a produção de progesterona pelo corpo lúteo (MANN; HARESIGN, 2001), provavelmente pelo retardamento na liberação de PGF2α pelo útero (MANN; LAMMING, 2000). Esta liberação de PGF2α mais tardiamente deve estar relacionada com uma menor expressão de receptores para ocitocina no endométrio de vacas com maiores concentrações sanguíneas de estradiol no pró-estro (MANN; LAMMING, 2000). Porém, este último mecanismo de ação, provavelmente, não é a principal causa deste aumento nas taxas de concepção nos animais de baixo escore corporal, pois todos os animais receberam um tratamento prévio de progesterona (dispositivo intravaginal por 8 dias) que, como observado anteriormente (SILVIA et al., 1991), pode diminuir a liberação prematura de PGF2α pelo endométrio. Além disso, os achados do presente experimento mostram que o

ECP não modificou o perfil de liberação de progesterona no ciclo estral subsequente à ovulação sincronizada.

A eCG parece estar melhorando a capacidade esteroidogênica do CL em uma fase crítica do desenvolvimento embrionário (Figura 12). Os mecanismos fisiológicos responsáveis pelo aumento das concentrações plasmáticas de progesterona em animais tratados com eCG pode estar relacionado com maior exposição aos efeitos de LH da molécula do eCG no período periovulatório. Pesquisas preliminaries (ALILA; HANSEL, 1984) sugerem que uma das causas do aumento nas concentrações circulantes de progesterona durante o diestro esta relacionado com a modificação da proporção de células grandes ao longo do ciclo estral. Estes pesquisadores mostraram que ao longo do diestro as células luteínicas pequenas se diferenciam em células luteínicas grandes. Pesquisas posteriores (MEE et al., 1993) também sugerem que maior exposição ao LH no período periovulatório pode alterar a proporção de células grandes (responsáveis por cerca de 80% da produção de progesterona pelo CL) e, desta forma, aumentar a concentração plasmática de progesterona. Portanto, é possível que a adição de eCG no momento da retirada do CIDR possa ter aumentado a proporção de células luteínicas grandes no CL devido a sua atividade de LH.

O tratamento com eCG na dose de 400 UI é altamente recomendado quando uma grande proporção dos animais se encontra em anestro (HUMBLOT et al., 1996; BARUSELLI et al., 2004). Existem muitos relatos de aumentos na fertilidade após a incorporação da eCG em protocolos para IATF (BARUSELLI et al., 2004). A melhora na taxa de concepção em animais que recebem a eCG na retirada do dispositivo intravaginal de P4, provavelmente, está relacionada ao aumento da taxa de ovulação de animais em anestro e aos maiores níveis de P4 circulante no diestro (BARUSELLI et al., 2004), minimizando falhas no reconhecimento embrionário da gestação (MANN; HARESIGN, 2001). No presente experimento, a eCG não aumentou a taxa de ovulação nos animais de menor escore corporal (com eCG = 87,5%, n = 8 vs sem eCG = 100,0%, n = 10; P > 0,10). Porém, o número limitado de unidades experimentais com baixa condição corporal impossibilitou testar conclusivamente se a melhora após o uso de eCG possa ser devido a melhora na taxa de ovulação.

No presente experimento, aparentemente, os animais de menor condição corporal apresentam menores níveis circulantes de progesterona se comparado aos

animais de maior condição corporal (Figura 14). Isto pode indicar que estes animais apresentaram menor produção de progesterona após a ovulação, provavelmente devido a menores concentrações circulantes de LH durante o diestro. Isto pode ser real se for considerado que, no presente experimento, a produção de leite foi similar entre animais de menor e maior condição corporal (menor ECC = 33,0 ± 2,6 kg/dia vs maior ECC = 35,6 ± 1,0 kg/dia; P > 0,10). Por outro lado, foi demonstrado que animais de menor condição corporal apresentam maior ingestão de matéria seca se comparado com animais de maior condição corporal (GANSWORTHY; TOPPS, 1982). Além disso, os autores relataram que animais de menor condição corporal produziram mais leite no pós-parto, o que não foi o caso no presente experimento, eventualmente devido a falta de poder estatístico para detectar diferenças na produção de leite (eventual erro tipo II). Assim, também é possível que os animais de menor condição corporal tenham realmente ingerido mais alimento, o que levou a menores concentrações séricas de progesterona (SANGSRITAVONG et al., 2002). Portanto, a condição corporal e o consequente nível de metabolismo hepático de esteróides e/ou a menor concentração de LH no diestro são provavelmente os responsáveis pelas diferenças de concentração de progesterona circulante entre os grupos de baixa ou alta condição corporal. Nestes casos, o tratamento com eCG poderia contribuir significativamente para melhorar a eficiência da IATF em vacas de leite de alta produção. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel da condição corporal na capacidade esteroidogênica e concentração circulante de progesterona no diestro de vacas de alta produção.

6 CONCLUSÕES

As hipóteses iniciais deste estudo foram parcialmente aceitas. Conforme a hipótese inicial, o uso de eCG no momento da retirada do CIDR aumentou a taxa de concepção se comparado ao grupo controle (G2 > G4). Porém, esta melhora na fertilidade após o uso de eCG é, exclusivamente, devido ao aumento na taxa de concepção em vacas com menor escore de condição corporal. A hipótese do aumento na taxa de concepção após o tratamento com ECP foi rejeitada (G3 = G4). A hipótese do efeito aditivo na taxa de concepção após o tratamento com eCG e ECP no momento da retirada do CIDR também foi rejeitada (G1 = G4). Portanto, os achados deste estudo são indicativos que o uso de eCG em protocolos de IATF que utilizam dispositivos de progesterona aumentou as taxas de concepção em vacas de leite de alta produção, provavelmente por aumentar os níveis de progesterona circulante após a ovulação sincronizada em animais de menor condição corporal. Mais experimentos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos de ação da eCG em bovinos em lactação inseminados em tempo fixo.

CAPÍTULO II

Efeitos da eCG e do escore de condição corporal nas características do CL e progesterona circulante em vacas de leite

1 HIPÓTESE

Baseado nos resultados do experimento realizado no Capítulo I, a hipótese do presente experimento é de que os animais com baixo escore de condição corporal apresentam menor volume de CL e menores concentrações plasmáticas de P4. Estes animais, quando tratados com eCG apresentariam maior volume de CL, maior fluxo sanguíneo no CL, maior proporção de células luteínicas grandes e maiores concentrações plasmáticas de P4 no diestro.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do tratamento com eCG e do escore de condição corporal no volume, na concentração plasmática de P4, na concentração plamática de eCG, no fluxo sanguíneo e nas características histológicas do CL formado após a ovulação sincronizada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANEJO

As unidades experimentais utilizadas foram vacas holandesas em lactação, provenientes de duas fazendas (n = 16, Fazenda A e n = 9, Fazenda B) do tipo *Tie-stall* (Figura 1) localizadas na região de Madison-WI/EUA. O período experimental foi de Fevereiro a Março de 2007. Os animais selecionados apresentavam escore de condição corporal (ECC, EDMONSON et al., 1989) de 2,0 a 2,5 (grupo de menor ECC) ou de 3,0 a 3,5 (grupo de maior ECC). A média de produção de leite (calculada pela média diária durante todo o período experimental) e de dias em lactação (DEL) dos animais foi de 34,2 ± 2,0 Kg/dia e 162,2 ± 21,6 DEL, respectivamente. A dieta de todos os animais era constituída, principalmente, a base de silagem de milho e concentrado de milho e soja. Em todas as fazendas a dieta foi balanceada para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para vacas holandesas em lactação (NRC, 2001). Todas as recomendações de boas práticas de manejo com relação ao bem estar animal foram criteriosamente respeitadas durante todo o período experimental.

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Tie-stall*; Dairy Cattle Center, Universidade de Wisconsin-EUA)

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS

Dispositivo intravaginal de progesterona (Eazi-Breed CIDR® containing 1,38 g of P4, InterAg Company, Hamilton, New Zealand). Prostaglandina F2α (Lutalyse®, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, MI). Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, Cystorelin®, Merial Limited, Iselin, NJ). Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon; Intervet; Brasil). Óleo de sezamo e benzoato de estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Álcool benzílico (EM Science, Cherry Hill, NJ). O benzoato de estradiol (BE) foi diluído no álcool benzílico para produzir uma solução inicial de 5 mg/mL. Em seguida, o óleo de sezamo foi adicionado nesta solução inicial de BE + álcool para se obter uma solução final de 1mg/ml. Todos os tratamentos hormonais exceto o dispositivo intravaginal foram realizados por via intramuscular.

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS

Todos os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) no D10. No dia da retirada do dispositivo de P4 (D2), todas as vacas receberam um tratamento com PGF2α (Lutalyse). Neste momento (D8), os animais foram homogeneamente divididos em 2 grupos: 1) eCG (400 UI) no Dia 8 + GnRH (100 mcg) após 48h; e 2) GnRH (100 mcg) após 48h. A sequência de procedimentos durante todo o período de coleta de dados está representado na figura 2.

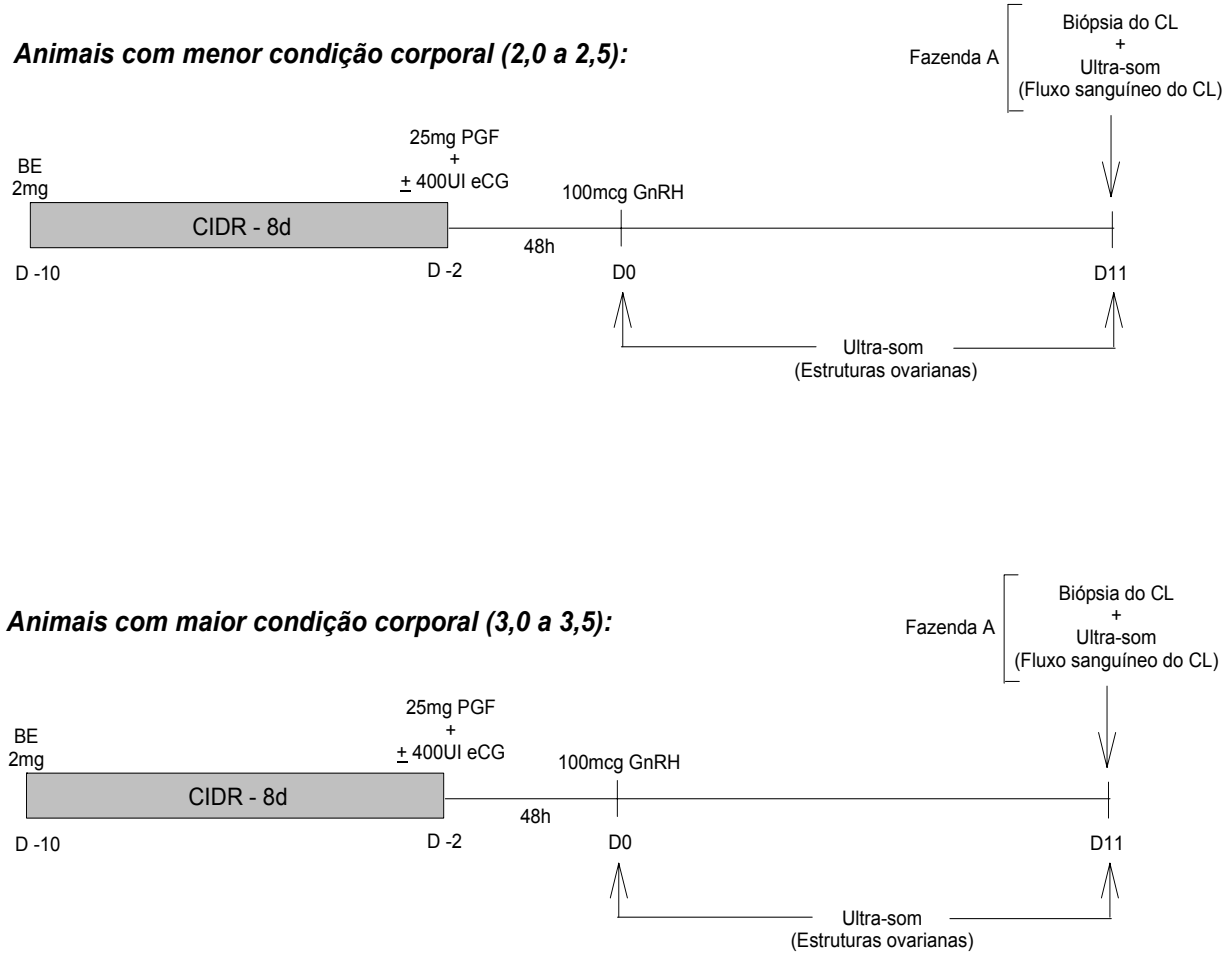


Figura 2 - Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; condição corporal X tratamento com eCG)

3. 4 AVALIAÇÕES ULTRA-SONOGRÁFICAS CONVENCIONAIS E COLETA DE SANGUE

Na fazenda A, foram efetuados exames ultra-sonográficos e coletas de sangue diariamente a partir do Dia 0 (momento da aplicação do GnRH) até o Dia 11. Na fazenda B, os mesmos procedimentos ocorreram somente nos Dias 0, 4, 6, 8 e 11. O volume do CL foi calculado como descrito anteriormente no Capítulo I; sendo que o volume da cavidade do CL, quando presente, foi descontado do volume final do CL.

3.5 DOSAGENS HORMONAIS

As amostras de sangue foram coletadas na veia caudal, centrifugadas a 1600 x g por 20 minutos e as amostras de soro foram imediatamente acondicionadas em temperaturas de - 20°C até o momento da análise hormonal para progesterona (P4) e estradiol-17β (E2). A progesterona circulante foi avaliada utilizando o kit para P4-RIA (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Os valores do CV intra- e interensaio para analise de P4 foram 4,3% e 0,6%, respectivamente. As amostras para analise de estradiol foram duplamente extraídas com éter dietílico e analisadas por RIA como descrito previamente (KULICK et al., 1999). Os valores do CV intra- e inter-ensaio para a análise de E2 foram 4,3% e 0,6%, respectivamente. A sensibilidade foi de 0,08 ng/mL durante a dosagem de P4 e 0,6 pg/mL durante a dosagem de E2. A concentração circulante de eCG foi medida por RIA de LH equino como descrito previamente (BOLT et al., 1990). A porcentagem de reação cruzada para o ensaio de LH equino com a eCG foi de 1,0%, o CV intra-ensaio foi de 5,7%, e o teste apresentou sensibilidade de 0,3 ng/mL.

3.6 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO COLOR-DOPPLER

O fluxo sanguíneo no CL foi determinado com o auxílio de um ultra-som Doppler (Sonosite TITAN, Sonosite Inc., Bothell, USA) equipado com uma probe linear de 6.1 Mhz multifrequencial. No modo color-Doppler, os sinias coloridos foram utilizados para se determinar os sinais de fluxo sanguíneo do CL. O ganho do foco e ajustes de cor do ultra-som Doppler foram os mesmos durante todos os exames. O sistema foi otimizado (modo “Low”) para aumentar a sensibilidade de detecção do fluxo sanguíneo (TITAN™ Ultrasound System User Guide, Sonosite Inc., Bothell, USA). O máximo tamanho da caixa de detecção do fluxo sanguíneo ou Região de Interesse (RI) foi escolhida. O exame ultra-sonográfico com o modo color-Doppler foi efetuado no Dia 11 após a ovulação sincronizada. Todos animais receberam anestesia peridural-caudal (4 mL de Lidocaina 2%, Phoenix Pharmaceutical, Inc., EUA) antes do exame com color-Doppler. Imagens em tempo real do B-mode/color-

Doppler foram gravadas com o auxílio de um sistema digital (Sony DCR-TRV38 MiniDV Digital Handycam Camcorder, Sony, Japão). As imagens foram gravadas para posterior analise dos pixels. Uma imagem de cada CL e seu respectivo fluxo sanguíneo (porção colorida na imagem) foi selecionada por apenas um técnico sem conhecimento prévio dos grupos experimentais a partir dos vídeos de gravações do exame ultra-sonográfico de Doppler efetuada em 14 dos 16 animais na Fazenda A (2 animais não ovularam). As imagens foram selecionadas baseadas no maior diâmetro do CL e na qualidade da imagem do fluxo sanguíneo detectado pelo Doppler. O número de pixels coloridos nas imagens selecionadas foi determinado como descrito anteriormente (GINTHER; UTT, 2004). A mesma escala de cor foi utilizada como controle positivo na seleção dos pixels coloridos em todas as imagens. A porcentagem do fluxo sanguíneo do CL foi calculada dividindo-se o número total de pixels coloridos pelo número de pixels não coloridos como descrito anteriormente (GINTHER et al., 2007).

3.7 BIÓPSIA E MICROSCOPIA DO TECIDO LUTEÍNICO

A biópsia do CL foi efetuada no Dia 11, somente nos animais localizados na Fazenda A. Todas as vacas receberam anestesia epidural-caudal (4 mL de Lidocaina 2%, Phoenix Pharmaceutical, Inc., EUA) antes do procedimento de biópsia. Foi utilizado um ultra-som com guia transvaginal (probe convexa de 7,5 Mhz, Aloka SSD-900V, Aloka Co., Wallingford, CT), com o auxílio de agulha para biópsia apropriada (Quick-core cutting needle; Cook Medical Inc, EUA). Em seguida, 2 amostras de tecido luteínico de cada animal foi colocado em solução de Bouin por 3 horas. Após este período, as amostras de tecido luteínico foram colocadas em solução aquosa de álcool etílico (70%). Após 24 horas, foram preparados blocos de parafina e 4 cortes de regiões diferentes de cada biópsia de CL foi corada com solução de hematoxilina-eosina (HE). Em seguida, foram analisados aleatoriamente 8 campos por lâmina (2 campos por corte por lâmina). Foram avaliadas pelo menos 200 células por campo. O software GIMP® foi utilizado para a avaliação das células luteínicas grandes e pequenas. A classificação histológica das células do CL foi efetuada como descrito anteriormente (DIAZ et al., 2002).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o proc MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). A unidade experimental “vaca” foi o objeto das medidas repetidas ao longo do tempo. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências. Todos os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO CIRCULANTE DE ECG

A figura 3 descreve o perfil das concentrações circulantes de eCG atingidas após o tratamento com 400 UI deste fármaco no momento da retirada do dispositivo intra-vaginal de P4 (Dia -2). As concentrações de eCG sanguíneo parecem aumentar de maneira constante até 48 horas após a aplicação do fármaco e 72h depois do tratamento os níveis circulantes de eCG se encontram em níveis basais (Figura 3). Deste modo, as concentrações de gonadotrofina equina no sangue das vacas em lactação tratadas com eCG tendeu (P < 0,10) a ser diferente às 24h após a aplicação, e foi significativamente (P < 0,05) diferente às 48 horas após a aplicação da eCG. Outro aspecto a ser relatado foi a grande variação da concentração de eCG circulante, demonstradas pelas barras de erro padrão presentes na figura 3.

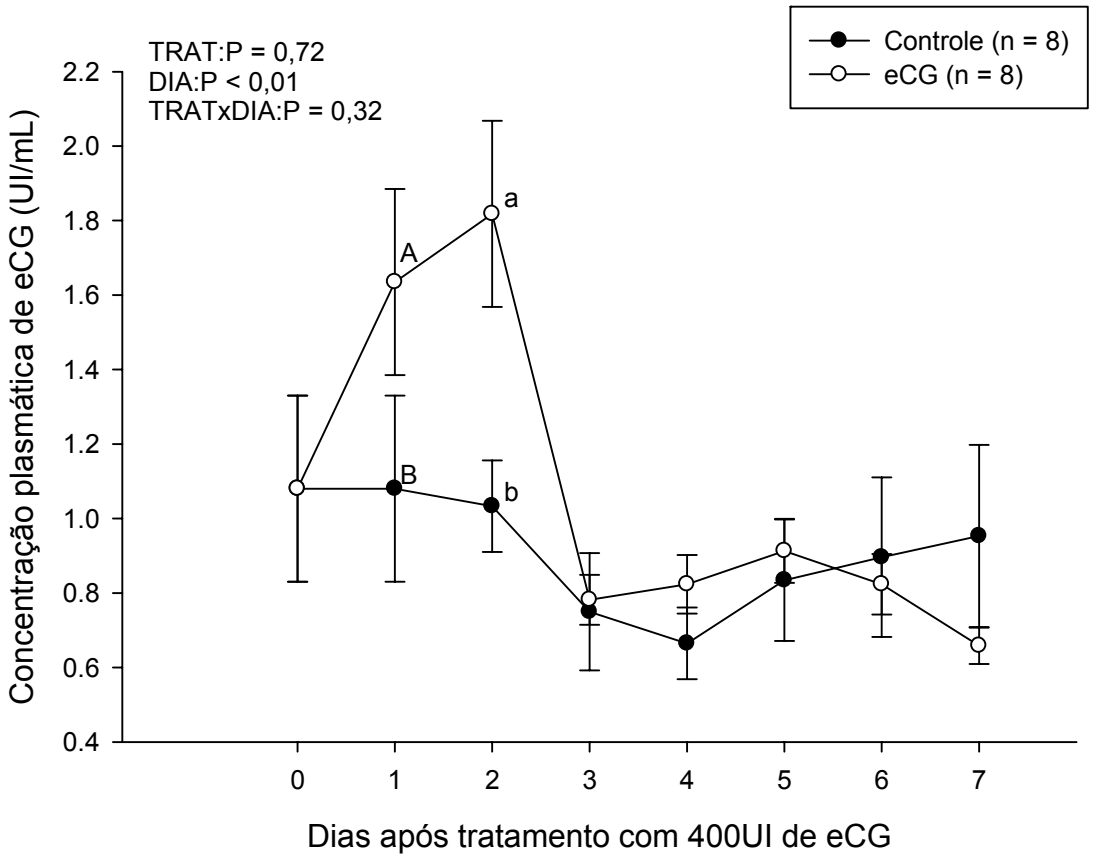


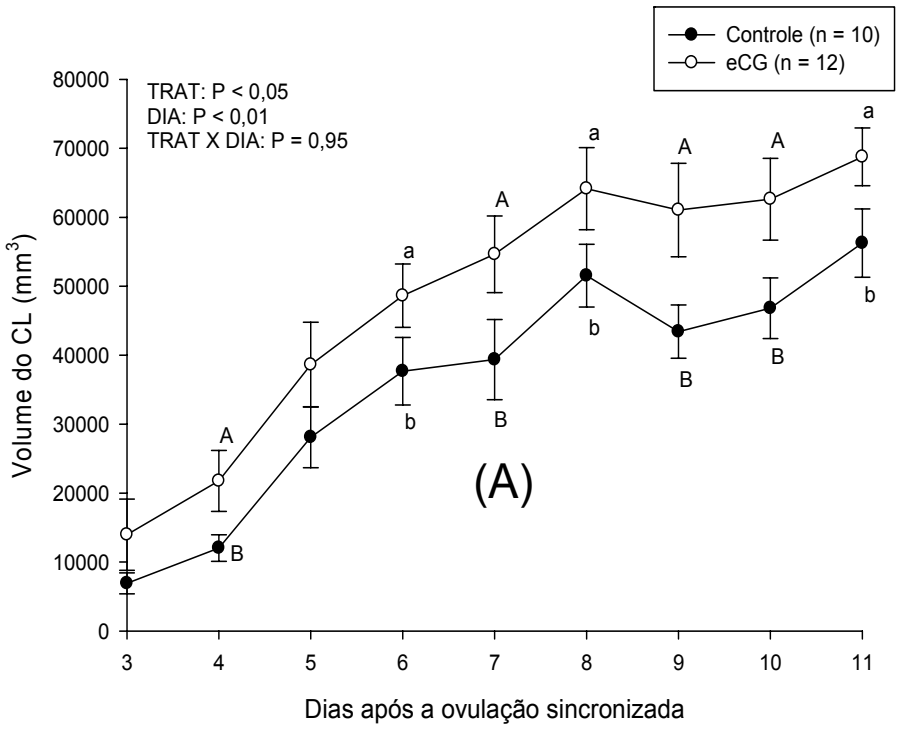
Figura 3 - Concentração plasmática de eCG (média ± erro padrão da média) em vacas holandesas em lactação após aplicação de 400UI de eCG. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10

4.2 VOLUME DO CL E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA

Não houve interações significativas entre tratamento com eCG e a condição corporal para nenhuma variável estudada. O diâmetro do folículo dominante dos animais que ovularam após os protocolos hormonais não foi afetado pelo tratamento com eCG (eCG = 15,8 ± 0,8 vs Controle = 16,0 ± 0,8; P = 0,71) ou escore de condição corporal (menor ECC = 15,2 ± 0,8 vs maior ECC = 16,5 ± 0,7; P = 0,35).

O tratamento com eCG não alterou a concentração plasmática de E2 no momento da aplicação de GnRH (eCG = 3,7 ± 0,3 pg/mL vs sem eCG = 3,6 ± 0,2 pg/mL; P > 0,10). Em geral o volume do CL apresentou correlação positiva com a progesterona circulante (r = 0,60; P = 0,04). Além disso, o volume do CL formado após a ovulação sincronizada foi afetado pelo tratamento com eCG e condição corporal do animal. As vacas tratadas com eCG apresentaram maior (Dias 6, 8 e 11) ou tenderam a apresentar maior (Dias 4, 7, 9 e 10) volume de tecido luteal se comparado ao grupo de animais que não recebeu nenhum tratamento com eCG. Surpreendentemente, apesar do maior volume do CL no grupo tratado com eCG, os níveis circulantes de P4 foram maiores (P < 0,05) no grupo de animais tratados com eCG somente 11 dias após a ovulação sincronizada (Figura 4).

O ECC não alterou as concentrações plasmáticas de E2 no momento da aplicação do GnRH (menor ECC = 3,8 ± 0,2 pg/mL vs maior ECC = 3,3 ± 0,3 pg/mL; P > 0,10). De maneira similar, o escore de condição corporal dos animais parece ter afetado o volume do CL e, mais acentuadamente, os níveis circulantes de P4 (Fig. 5). Como mostrado na figura 5, os animais de menor condição corporal apresentaram menor (Dias 8 e 11) ou tenderam a apresentar menor (Dias 4, 6, 7, 9 e 10) volume de CL se comparado aos animais de maior condição corporal. Do contrário do ocorrido com os animais que receberam eCG, os efeitos da presença de maiores volumes de tecido luteínico nos animais de maior ECC afetaram os níveis circulantes de P4 mais antecipadamente no diestro; sendo que diferenças significativas na concentração de P4 foram detectadas já nos Dias 4, 6 e 8 (Fig. 5) entre os animais com baixo ou alto escore corporal.



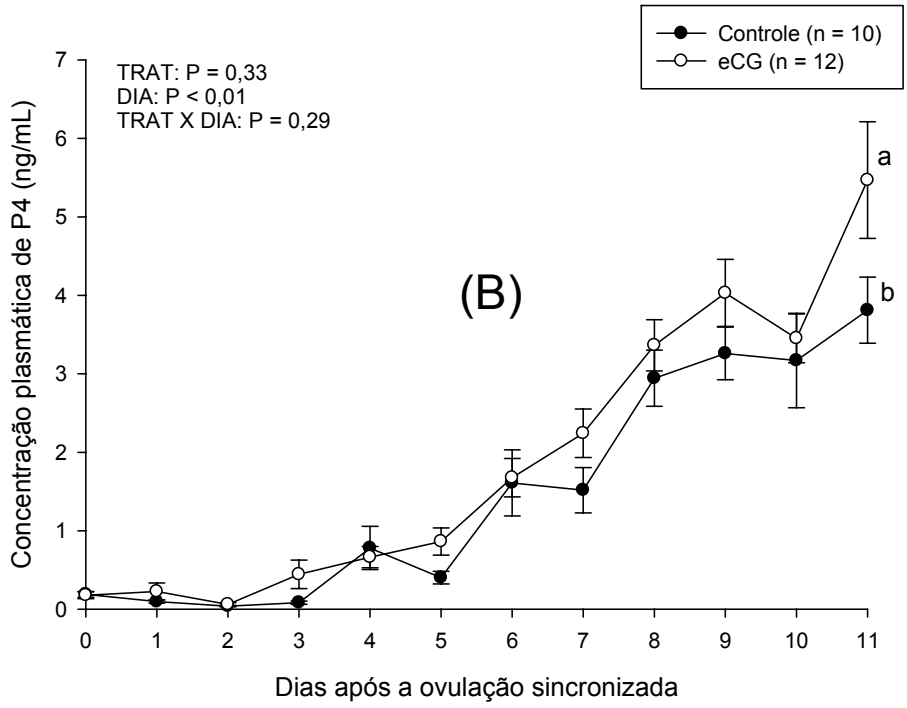


Figura 4 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do tratamento com eCG no volume do CL (A) e na concentração plasmática de progesterona (B) após a ovulação sincronizada. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10

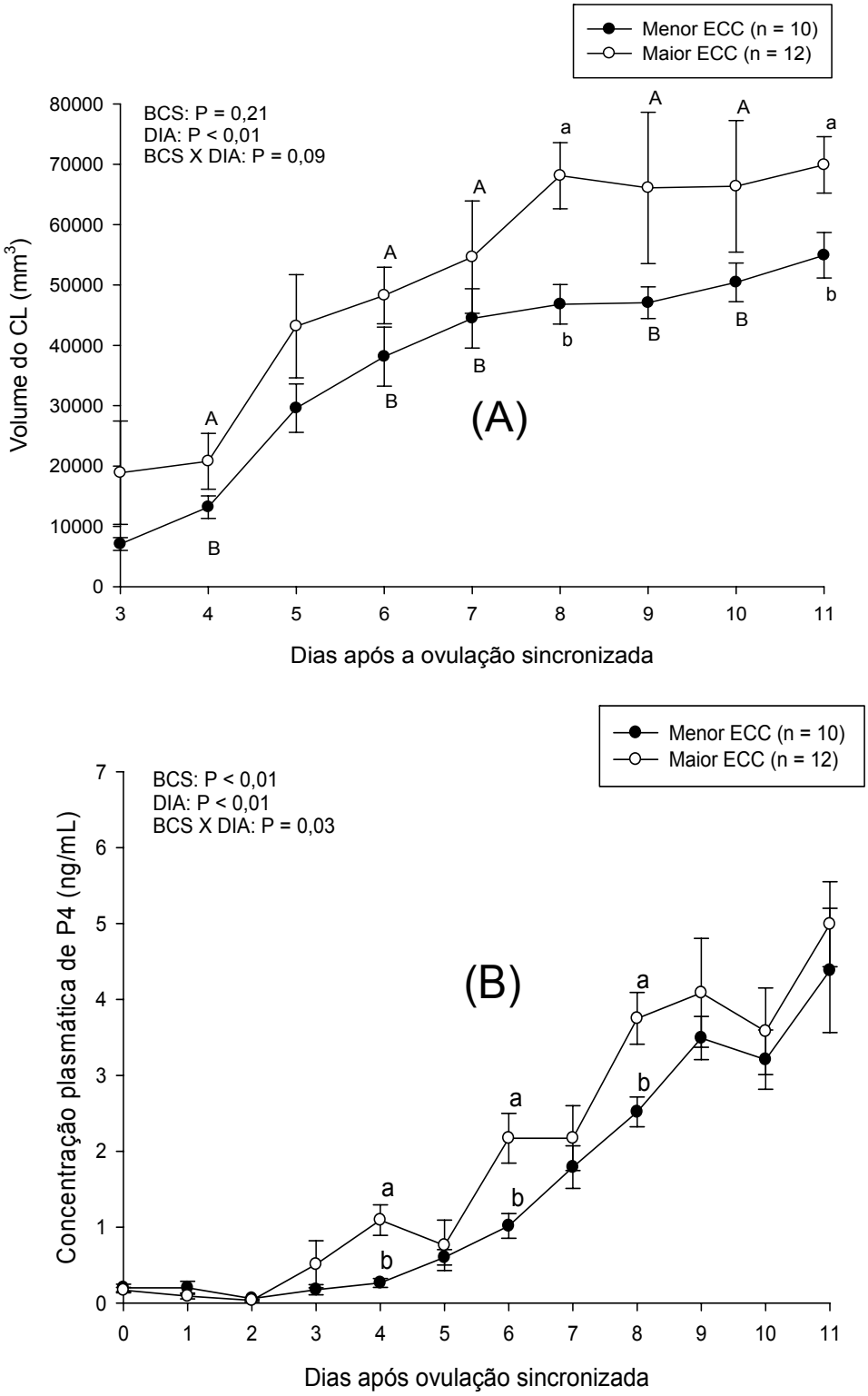


Figura 5 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (ECC) no volume do CL (A) e progesterona circulante (B) após a ovulação sincronizada. [a,b] As médias diferem estatisticamente, P < 0,05; As médias tendem a ser diferentes, [A,B] P < 0,10

4.3 FLUXO SANGUÍNEO NO CL

Do total de 14 animais da Fazenda A, apenas 11 foram utilizados nas analises de fluxo sanguíneo do CL, 6 animais no grupo controle e 5 no grupo tratado com eCG. Isto ocorreu pois 2 animais não ovularam após o protocolo de sincronização e 1 animal (grupo controle) apresentou ciclo curto. Além disso, 2 animais apresentaram duplas ovulações e devido à grande quantidade de tecido luteínico e certas limitações do equipamento portátil color-Doppler (caixa de imagem Doppler menor que o tamanho do tecido luteínico), não foi possível avaliar adequadamente o fluxo sanguíneo no CL destes animais. Portanto, somente animais com ovulações simples foram utilizados nas analises de pixels. A figura 6, mostra um exemplo do aspecto das imagens feitas pelo ultra-som color-Doppler do fluxo sanguíneo de dois tipos de CL, um com alto e outro com baixo fluxo sanguíneo.

Não foi verificado interação ($P > 0,10$) entre o tratamento com eCG e a condição corporal em nenhuma variável estudada. As características do CL não também parecem ter sido afetadas consideravelmente pelo tratamento com eCG ou pelo ECC dos animais. Os dados apresentados na tabela 1, mostram que apenas a área total em pixels do CL nos animais que receberam eCG tendeu ($P = 0,10$) a ser maior que a área total do CL dos animais que não receberam eCG. Porém, apesar das diferenças numéricas, tanto o fluxo total de sangue no CL como a razão do fluxo de sangue pela área total do CL não foram afetadas pelo tratamento com eCG (Tabela 1) ou pelo estado corporal dos animais experimentais (Tabela 2).

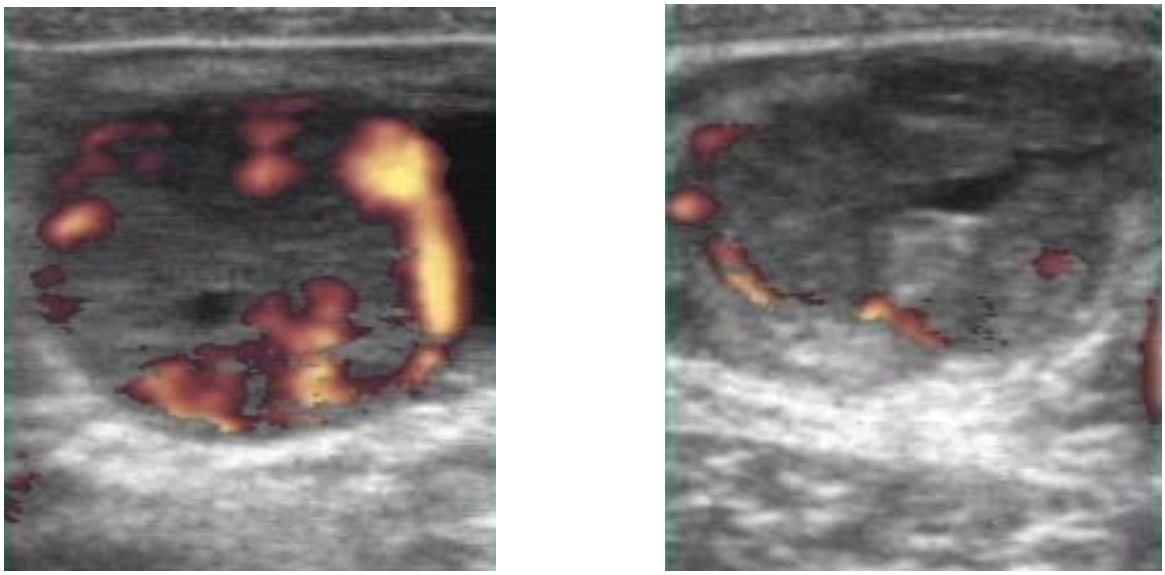


Figura 6 - Imagem de CL com alto (esquerda) ou baixo (direita) fluxo sanguíneo (colorido) com utilização de ultra-sonografia color-Doppler

4.4 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO CL

Como descrito anteriormente por muitos autores (DIAZ et al., 2002), foram encontradas duas populações distintas de células luteínicas. A figura 7 mostra em detalhe a presença de células grandes (G) e pequenas (P) no corte histológico de CL no dia 11 após a ovulação. Não foi verificada nenhuma alteração na proporção de células grandes e pequenas, assim como no tamanho médio destas células luteínicas em animais tratados ou não com eCG e de menor ou maior ECC (Tabelas 1 e 2).

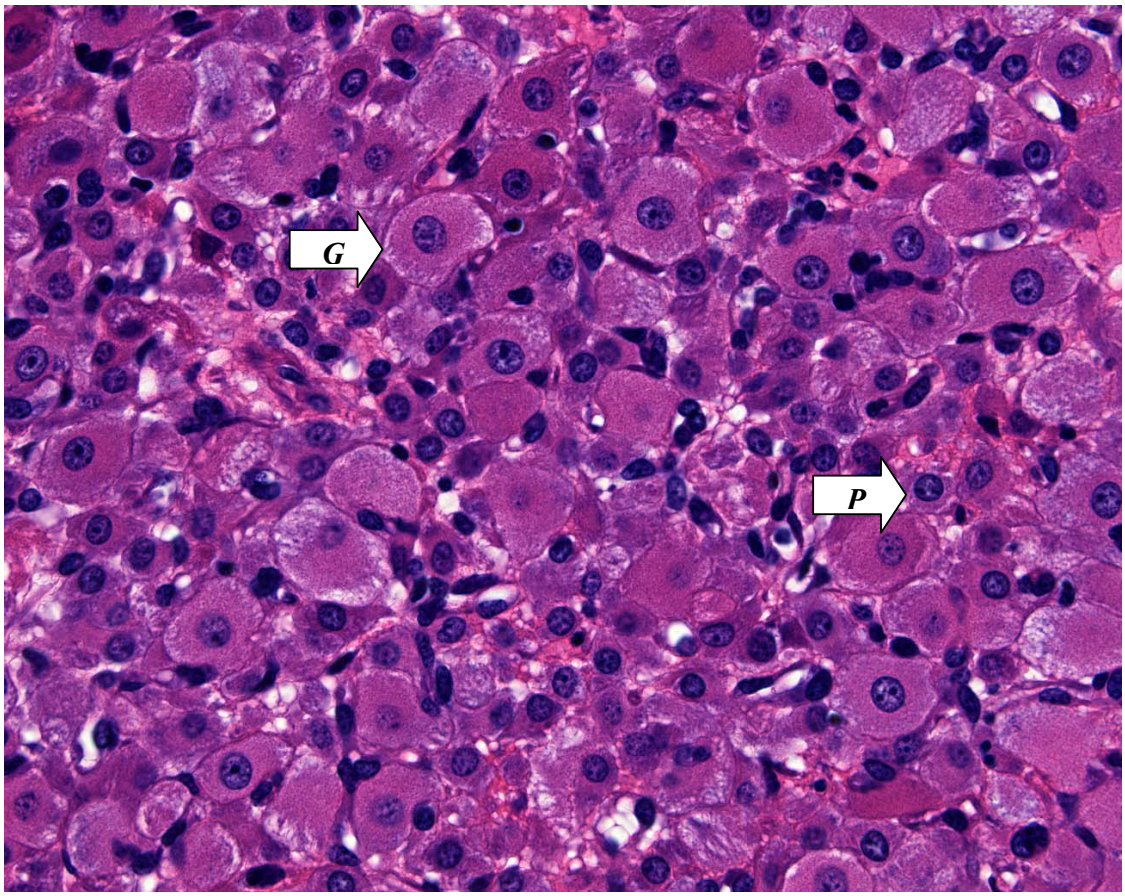


Figura 7 - Corte histológico de um CL no 11 dias após a ovulação. Coloração em HE. Note a presença de 2 tipos de células luteais: grande (G) e pequena (P)

Tabela 1 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do tratamento com 400 UI de eCG nas características ultra-sonográficas e histológicas do CL de vacas holandesas de alta produção, 11 dias após a ovulação sincronizada

	eCG	Controle	P-value
Área total do CL (pixels)	22016,0 ± 707,8 (n = 5)	20265,5 ± 1013,4 (n = 6)	0,10
Área do fluxo sanguíneo no CL (pixels)	9239,4 ± 1608,5 (n = 5)	7465,0 ± 872,9 (n = 6)	0,36
Razão do fluxo sanguíneo/área total	0,43 ± 0,08 (n = 5)	0,37 ± 0,04 (n = 6)	0,72
Diâmetro médio das células grandes (µm)	26,45 ± 0,62 (n = 12)	26,95 ± 0,53 (n = 11)	0,56
Diâmentro médio das células pequenas (µm)	11,88 ± 0,14 (n = 12)	12,16 ± 0,14 (n = 11)	0,17
Razão das células grandes/pequenas	0,22 ± 0,03 (n = 12)	0,23 ± 0,04 (n = 11)	0,94

Tabela 2 - Efeito principal (média ± erro padrão da média) do escore de condição corporal (maior ECC = 3,0 a 3,5; menor ECC = 2,0 a 2,5) nas características ultra-sonográficas e histológicas do CL de vacas holandesas de alta produção, 11 dias após a ovulação sincronizada

	Alto ECC	Baixo ECC	P-value
Área total do CL (pixels)	20855,5 ± 2191,5 (n = 5)	21106,9 ± 740,5 (n = 6)	0,64
Área do fluxo sanguíneo no CL (pixels)	5591,0 ± 78,0 (n = 5)	8867,2 ± 954,6 (n = 6)	0,23
Razão do fluxo sanguíneo/área total	0,28 ± 0,03 (n = 5)	0,43 ± 0,05 (n = 6)	0,16
Diâmetro médio das células grandes (µm)	25,56 ± 0,48 (n = 13)	27,18 ± 0,47 (n = 10)	0,61
Diâmentro médio das células pequenas (µm)	11,81 ± 0,14 (n = 13)	11,97 ± 0,14 (n = 10)	0,51
Razão células grandes/pequenas	0,19 ± 0,05 (n = 13)	0,24 ± 0,02 (n = 10)	0,31

5 DISCUSSÃO

Existem muitas evidências de que utilização de hormônios que induzem superstimulação induzem aumentos da vascularização do CL (DOLDI et al., 1997a,b). Outros autores, descreveram correlações positivas entre a expressão de fatores de crescimento do endotélio vascular e o uso de hormônios superistumulantes como o FSH em ovinos (REDMED et al., 1996) e em bubalinos (PAPA et al., 2006). Ainda, foi descrito recentemente altas correlações entre o nível de vascularização do CL e a produção de progesterona em bovinos (KOBAYASHI et al., 2001). Porém, os achados do presente experimento não detectaram correlações significativas entre a progesterona circulante e o nível de vascularização do CL, detectado por meio de ultra-som color-Doppler ($r = 0,47$; $P = 0,13$). É possível que, no presente experimento, o número limitado de observações tenha diminuído as chances de detecção destas correlações. Além de maior número de observações, os experimentos futuros devem utilizar equipamentos de maior sensibilidade na detecção do fluxo sanguíneo.

Devido aos possíveis efeitos da produção de leite no volume do CL e na progesterona circulante descritos por outros autores (SANGSRITAVONG et al., 2002; SARTORI et al., 2002a), a produção de leite dos animais foi utilizada em todos os modelos estatísticos para estas variáveis. Além disso, a produção de leite média durante todo o período experimental não diferiu ($P > 0,10$) entre os grupos (sem eCG e menor ECC = 32,1 ± 2,9; sem eCG e maior ECC = 35,3 ± 5,5; com eCG e menor ECC = 35,5 ± 4,8; com eCG e maior ECC = 34,0 ± 3,1). Portanto, o nível de produção de leite e, por consequência, a taxa do metabolismo hepático de hormônios que poderia afetar a concentração circulante de P4 e o volume do CL foi semelhante ($P > 0,10$) entre os grupos.

Apesar do tratamento com eCG aumentar o volume do CL anteriormente se comparado com animais que não receberam eCG, as concentrações de progesterona circulantes somente foram maiores mais tardiamente durante o diestro. Isto pode indicar que doses maiores de eCG sejam necessárias para aumentar consistentemente a progesterona circulante de vacas de leite de alta produção. Além disso, no presente experimento, o escore de condição corporal parece afetar de maneira mais consistente o volume e principalmente as concentrações de

progesterona no diestro, provavelmente devido à menor concentração de LH circulante nos animais de menor condição corporal ou sob balanço energético negativo (BUTLER et al., 1989). Portanto, se a eCG pode aumentar a capacidade esteroidogênica do CL, maiores doses deste fármaco devem ser necessárias em vacas de leite de alta produção, principalmente para animais de menor escore corporal.

As células luteínicas esteroidogênicas podem ser classificadas em células grandes e pequenas. Em geral, as células luteínicas grandes apresentam certas características como o diâmetro entre 23 a 50µm, núcleo esférico, presença de grânulos nucleares. Além disso, as células grandes apresentam menor razão núcleo/citoplasma que as células pequenas. As células pequenas apresentam diâmetro entre 12 a 22µm, e núcleo de formato irregular (DIAZ et al., 2002). Estudos anteriores (SCHMITT et al., 1996), observaram aumento no tamanho médio de células luteínicas pequenas após o estímulo com dois tipos de tratamentos hormonais (Controle = 11,6µm; GnRH = 12,3µm; e hCG = 13,1µm). Este mesmo estudo também encontrou uma tendência de aumento do tamanho médio das células luteínicas grandes nos animais tratados (Controle = 28,1µm; GnRH = 31,4µm; e hCG = 30,9µm). Além disso, Schmitt el al. (1996) não encontraram diferenças no número e proporção de células grandes e pequenas após o estímulo gonadotrófico. Os dados do presente experimento não indicam nenhuma modificação do tamanho ou proporção de células grandes e pequenas no CL, o que contraria os achados em relação a variação do volume do CL conforme tratamento com eCG e escore de condição corporal. Assim, a diferença no volume do CL dos animais tratados ou não com eCG, e com diferentes escores de condição corporal pode estar relacionada ao número total de células esteroidogênicas (grandes e pequenas), aos outros tipos de células presentes no CL (ex: células endoteliais e pericitos), ou mesmo devido ao espaço intercelular dentre os diferentes tipos celulares. Por exemplo, como descrito por Doldi et al. (1997a,b), o tratamento com eCG pode aumentar a quantidade de tecido endotelial e consequentemente o volume total do CL.

Em relação ao aumento da concentração plasmática de progesterona no diestro, estudos anteriores demonstraram que maiores níveis de LH no início do ciclo estral parecem aumentar a produção de progesterona pelo corpo lúteo (PETERS et al., 1994). Assim, é possível que o aumento da progesterona circulante seja devido à

maior exposição ao LH no início do diestro nos animais tratados com eCG. Porém, é sabido que estes maiores níveis de LH, provavelmente, atuam somente em células luteínicas pequenas, devido ao maior número de receptores para LH neste tipo de célula (DIAZ et al., 2002). Um possível mecanismo pelo qual o LH pode aumentar a produção de progesterona pode estar relacionado com a proteína StAR (KOHEN et al., 2003). Esta proteína é responsável pelo transporte do colesterol para o interior da mitocôndria no processo de produção de progesterona. Os estudos realizados por Kohen et al. (2003) sugerem que o aumento das concentrações circulantes de progesterona após o tratamento com hCG estão relacionados às maiores taxas de transcrição do gene para proteína StAR. Mais estudos são necessários para elucidar os eventuais mecanismos de ação fisiológicos do eCG no CL de bovinos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente experimento confirmam a hipótese de que animais de menor condição corporal apresentariam menor volume e concentração plasmática de progetrona no diestro. Porém a hipótese de que a eCG aumentaria o volume e a concentração plasmática de progesterona no diestro somente em animais de menor condição corporal foi rejeitada, pois não foi verificada a interação entre o tratamento com eCG e a condição corporal. O tratamento com eCG aumentou o volume do CL, porém se verificou elevação das concentrações plasmáticas de progesterona somente 10 dias após a ovulação. O escore corporal dos animais afetou tanto o volume quanto a concentração de progesterona a partir de fases iniciais do diestro. A quantidade de fluxo sanguíneo no CL e as características das células luteínicas grandes e pequenas não foram alteradas após o tratamento com eCG ou em animais de baixo ou alto escore condição corporal, contrariando a hipótese inicial deste estudo.

CAPÍTULO III

Tipo de CIDR (novo ou usado) e do uso de ECP em protocolos que utilizam GnRH como indutor ovulatório em vacas de leite

1 HIPÓTESE

O tratamento com ECP no final de protocolos hormonais que utilizam eCG (para aumentar a capacidade esteroidogênica do CL) e GnRH (para causar maior sincronização do momento da ovulação) aumenta a taxa de concepção em vacas de leite de alta produção. Ainda, a taxa de concepção após o uso do dispositivo intravaginal novo é similar à taxa de concepção após o uso do dispositivo usado (previamente usado por 8 dias).

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da aplicação de ECP na taxa de concepção após o uso de protocolos que utilizam eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona e GnRH como indutor ovulatório em dois períodos do ano (verão x inverno).

- Comparar a taxa de concepção entre o dispositivo intravaginal novo (sem prévia utilização) e o usado (previamente utilizado por 8 dias) na taxa de concepção de vacas holandesas de alta produção em dois períodos do ano (verão x inverno).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANEJO

As unidades experimentais utilizadas foram vacas holandesas em lactação (n = 198, no verão; n = 190, no inverno). A média de dias em lactação dos animais tratados no verão foi de 196,1 ± 10,8 dias e no inverno foi de 188,5 ± 8,6 dias. O experimento foi efetuado em 1 rebanho leiteiro sob sistema confinado do tipo *Free-stall* (Figura 1), localizado no estado de São Paulo (Fazenda Santa Rita S/A). O período experimental foi de Janeiro a Fevereiro de 2007 (verão) e de Julho a Agosto de 2007 (inverno). A dieta de todos animais era constituída, principalmente, a base de silagem de milho e concentrado de milho e soja. A dieta foi balanceada para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para vacas holandesas em lactação (NRC, 2001). Todas as recomendações de boas práticas de manejo com relação ao bem estar animal foram criteriosamente respeitadas durante todo o período experimental.

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Sala de ordenha* - Fazenda Santa Rita, Descalvado – São Paulo)

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS

Dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR contendo 1,38 g de P4; Pfizer) novo (sem prévia utilização) e usado (previamente utilizado por 8 dias). Benzoato de estradiol (2 mg; Estrogin; Pharmavet). Prostaglandina F2α (25 mg; Lutalyse; Pfizer). Cipionato de estradiol (1 mg; ECP; Pfizer). GnRH (100 mcg; Fertagyl; Intervet). Gonadotrofina Coriônica Equina (400 UI; Folligon; Intervet). Todos os tratamentos hormonais exceto o dispositivo intravaginal foram realizados por via intramuscular.

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS

Todos os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (Estrogin) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) no D0. Sendo que metade dos animais recebeu dispositivos de progesterona previamente utilizados por 8 dias. No dia da retirada do dispositivo de P4 (D8), todas as vacas receberam um tratamento com PGF2α (25 mg, Lutalyse) e eCG (400 UI, Folligon). Neste momento (D8), os animais foram homogeneamente divididos em um delineamento fatorial 2 x 2 em 4 grupos: G1) CIDR novo + eCG (400 UI) + ECP (1 mg) no Dia 8; G2) CIDR usado + eCG (4 00UI) + ECP (1 mg) no Dia 8; G3) CIDR novo + eCG (400UI) no Dia 8; G4) CIDR usado + eCG (400UI) no Dia 8. Todos os animais receberam uma dose de GnRH 48h após a retirada do dispositivo de progesterona e foram inseminados em tempo fixo 8 às 10h após a aplicação de GnRH (Delineamento experimental, Figura 2). As taxas de concepção foram verificadas por meio de exames ultra-sonográficos 30 e 60 dias após a inseminação.

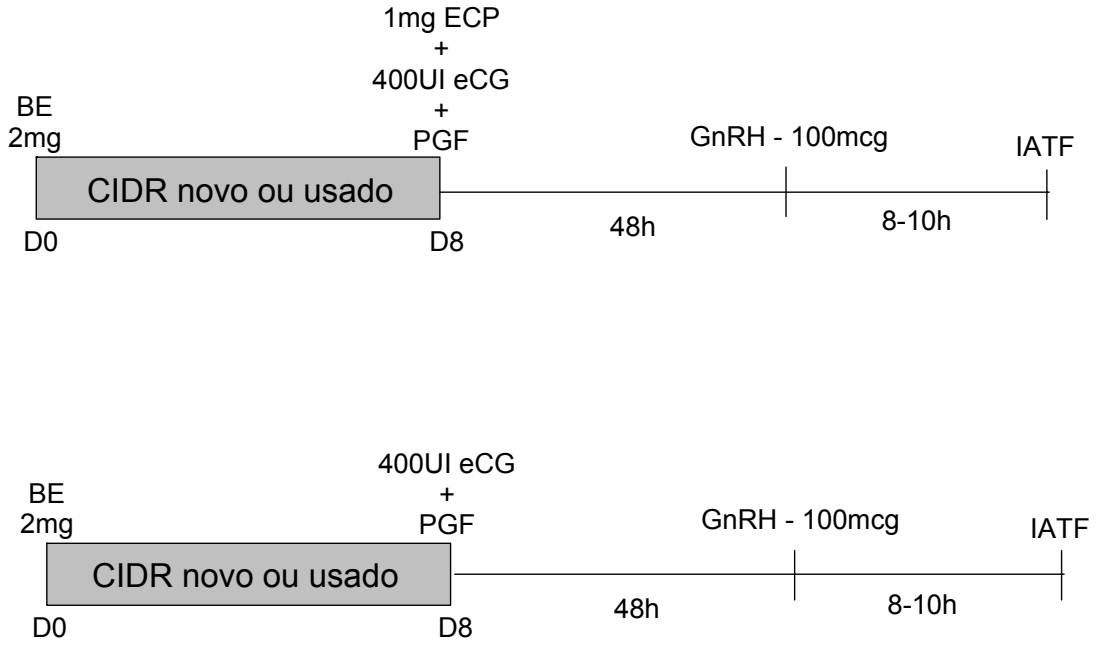


Figura 2 - Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X tratamento com ECP)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados binomiais foram analisados com o proc GLIMMIX do SAS, e a unidade experimental “vaca” foi incluída no modelo estatístico como variável de efeito aleatório. As informações de dias em lactação, número de inseminações prévias e número de lactações de cada animal, assim como suas interações, foram utilizadas nos modelos estatísticos. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências. Todos os dados estão expressos como medias ± erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O VERÃO

Na tabela 1 esta apresentada a taxa de concepção durante o verão de acordo com o grupo experimental aos 30 e 60 dias após a IATF. Em geral, não houve diferenças estatísticas (P > 0,10) na taxa de concepção entre os tratamentos hormonais. Além disso, não houve interação entre o tipo de CIDR e a utilização de ECP na retirada do dispositivo na taxa de concepção (P > 0,10). Os dados observados nos efeitos principais, indicam uma tendência (P = 0,09) de melhora na taxa de concepção aos 30 dias após a IATF, e melhora (P < 0,05) na taxa de concepção aos 60 dias após a IATF nos animais tratados com dispositivos intravaginais usados (previamente utilizados por 8 dias) quando comparados aos animais tratados com dispositivos novos. Ainda, independentemente do tipo de dispositivo utilizado (novo ou usado), o tratamento com 1 mg de ECP no momento da retirada do CIDR não alterou (P > 0,10) a taxa de concepção em vacas de leite de alta produção durante o verão (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o verão, e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1 mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)

Tratamento	n	TC* D30 (%)	TC* D60 (%)
CIDR novo com ECP	52	19,2	17,3
CIDR usado com ECP	49	24,5	24,5
CIDR novo sem ECP	49	12,2	10,2
CIDR usado sem ECP	48	22,9	22,9
		Efeitos principais	
Com ECP	101	21,8	20,8
Sem ECP	97	17,5	16,5
CIDR novo	101	15,8 [A]	13,9 [a]
CIDR usado	97	23,7 [B]	23,7 [b]

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/número total de IAs)
[a,b] Médias diferem estatisticamente; P < 0,05.
[A,B] Médias tenderam a ser diferentes estatisticamente; P < 0,10.

4.2 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O INVERNO

A tabela 1 esta apresentada a taxa de concepção durante o inverno de acordo com o grupo experimental aos 30 e 60 dias após a IATF. Em geral, não houve diferenças estatísticas (P > 0,10) na taxa de concepção entre os tratamentos hormonais. Além disso, não houve interação entre o tipo de CIDR e a utilização de ECP na retirada do dispositivo na taxa de concepção (P > 0,10). A melhora na taxa de concepção nos animais tratados com dispositivos intravaginais usados (previamente utilizados por 8 dias) quando comparados aos animais tratados com dispositivos novos não foi verificada no período do inverno. De maneira similar aos resultados da fase de verão, o resultado do peíodo do inverno, é sugestivo de que o tratamento com 1 mg de ECP no momento da retirada do CIDR não alterou (P > 0,10) a taxa de concepção em vacas de leite de alta produção (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o inverno, e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1 mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)

Tratamento	n	TC* D30 (%)	TC* D60 (%)
CIDR novo com ECP	48	35,4	31,3
CIDR usado com ECP	48	41,6	35,4
CIDR novo sem ECP	47	42,6	34,4
CIDR usado sem ECP	47	44,7	38,3
		Efeitos principais	
Com ECP	96	38,5	33,3
Sem ECP	94	43,6	36,2
CIDR novo	95	38,9	32,6
CIDR usado	95	43,2	36,8

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/número total de IAs)

4.3 RESULTADOS DE CONCEPÇÃO DURANTE O VERÃO E O INVERNO (DADOS COMBINADOS)

Independente do grupo experimental, os animais inseminados durante o período de inverno (n = 190) apresentaram maior (P < 0,01) taxa de concepção aos 30 dias (inverno = 41,1% vs verão = 19,7%) e 60 dias (inverno = 34,7% vs verão = 18,7%) após a IATF se comparado com os animais inseminados durante o verão (n = 198). Porém, a época do ano, apesar da diferença numérica a favor do verão, não parece ter influenciado a taxa de perda gestacional entre os 30 e 60 dias (inverno = 6,3% vs verão = 1,0%).

Não houve interação CIDR*época do ano, ECP*época do ano, ou CIDR*ECP*época do ano na taxa de concepção e perda gestacional (P > 0,10). Assim, os dados de concepção por época do ano serão descritos de maneira

combinada. Não se verificou diferenças na perda gestacional entre os 30 e 60 dias entre os grupos experimentais. Não houve efeito (P > 0,10) da adição do ECP no momento da retirada do CIDR na taxa de cocnepção. Os efeitos principais da comparação da taxa de concepção entre os tipos de CIDR (novo ou usado) apresentou tendência (P < 0,10) de melhora na taxa de concepção aos 60 dias após a IA nos animais tratados com CIDR reutilizado se comparado aos animais tratados com CIDR novo (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante duas épocas do ano (inverno e verão), e tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com ou sem adição de 1 mg de ECP no D8 (fatorial 2 x 2)

Tratamento	**n**	**TC* D30 (%)**	**TC* D60 (%)**
CIDR novo com ECP	100	27,0	24,0
CIDR usado com ECP	97	33,0	29,9
CIDR novo sem ECP	96	27,1	21,9
CIDR usado sem ECP	95	33,7	30,5
		Efeitos principais	
Com ECP	197	29,9	26,9
Sem ECP	191	30,4	26,2
CIDR novo	196	27,0	23,0 [A]
CIDR usado	192	33,3	30,2 [B]

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/número total de IAs)
[A,B] Médias tenderam a ser diferentes estatisticamente; P < 0,10.

5 DISCUSSÃO

Em geral, durante o verão, as taxas de concepção foram baixas. Provavelmente, devido ao estresse calórico verificado durante esta fase de realização do experimento. Sendo que diminuições da ordem de 20 a 30% nas taxas de concepção são comuns nos meses mais quentes do ano em vacas de leite de alta produção (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

A utilização de 1 mg de ECP no momento da retirada do CIDR provavelmente aumentou as concentrações circulantes de estradiol. Trabalhos recentes (SOUZA et al., 2005; SELLARS et al., 2006) descrevem aumentos ou tendência no aumento da concentração circulante de estradiol após o tratamento com 0,25 (SELLARS et al., 2006) ou 1 mg de ECP (SOUZA et al., 2005) em vacas de alta produção. Porém, ao contrário do esperado, a suplementação com ECP no momento da retirada do dispositivo intravaginal não melhorou significativamente as taxas de concepção dos animais sincronizados. Estes dados estão de acordo com outros autores, os quais não encontratam aumentos na taxa de concepção após o uso de estrógenos próximo à ovulação sincronizada (LOPES et al., 2000; PANCARCI et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2005; SELLARS et al., 2006). Porém, alguns autores descreveram aumentos na taxa de concepção após a suplementação com estrógenos no final dos protocolos de IATF (FIKE et al., 1997; COLAZO et al., 2004). Este aumento na fertilidade pode estar relacionado às maiores concentrações de estradiol antes da ovulação com consequente melhora no transporte espermático (HAWK et al., 1975a; GADDUM-ROSSE et al., 1981; ORIHUELA et al., 1999) e diminuição da porcentagem de animais apresentando ciclos de curta duração (MANN; LAMMING et al., 2000; MANN; HARESIGN, 2001). Porém, um estudo recente (SOUZA et al., 2007), utilizando vacas holandesas de alta produção, relataram que eventuais aumentos na taxa de concepção após a suplementação com estrógenos antes da ovulação sincronizada pode depender do escore de condição corporal, dos dias em lactação, e do tamanho do folículo ovulatório do animal. Estas variáveis podem ser a resposta para os resultados inconsistentes dos experimentos citados que tentaram relacionar a suplementação com estradiol próximo à ovulação e taxa de concepção. Além destes fatores, é possível que no presente estudo a morte embrionária precoce devido ao estresse térmico (DE

RENSIS; SCARAMUZZI, 2003) tenha mascarado os eventuais efeitos na melhora do transporte espermático e fertilização após a suplementação com estradiol.

Alguns relatos anteriores (MACMILLAN et al., 1991; MACMILLAN; PETERSON, 1993) indicam que o CIDR libera progesterona por pelo menos 15 dias e, deste modo, este tipo de dispositivo intravaginal de progesterona potencialmente pode ser utilizado por pelo menos 2 vezes em protocolos de sincronização de ovulação. O presente estudo, parece confirmar a possibilidade da utilização do CIDR previamente utilizado por 8 dias em protocolos de IATF que associam benzoato de estradiol e dispositivos contendo P4 em vacas de leite de alta produção. Na verdade, a tendência de melhora aos 30 dias e a melhora aos 60 dias após a IATF nas taxas de concepção no Grupo CIDR re-utilizado foi inesperada. Outros dois estudos, utilizando novilhas e vacas de corte, também compararam o uso de CIDR novos ou reutilizados em protocolos de IATF (COLAZO et al., 2004; SENEDA et al., 2004). De maneira semelhante aos resultados do presente experimento, Seneda et al. (2004), utilizando novilhas de corte cruzadas, tratadas com CIDR novos ou previamente utilizados por 8 dias também não encontraram diferenças no tamanho do folículo ovulatório (novo ~ 8,7mm vs. usado ~ 9,8mm) e na taxa de concepção (novo = 49,8% vs. usado = 44,0%). Colazo et al. (2004) realizou uma série de 3 experimentos para comparar a taxa de concepção entre animais tratados com CIDRs novos ou reutilizados. Em geral, Colazo et al. (2004) não encontraram nenhuma diferença na taxa de concepção (Experimento. 1 tostos estão por extenso - novilhas de corte; CIDR novo = 48,3% vs CIDR usado = 46,2%). O mesmo grupo de pesquisa encontrou em um outro experimento, utilizando vacas e novilhas de corte, maiores taxas de concepção em animais tratados com dispositivos intravaginais reutilizados por uma vez comparado a animais tratados com dispositivos reutilizados por duas vezes (CIDR reutilizado uma vez = 62,4% vs CIDR reutilizado duas vezes = 48,4%). Em um terceiro experimento, os autores compararam o uso de 1 CIDR novo, 1 CIDR reutilizado por uma vez, 1 CIDR reutilizado por duas vezes, e 2 CIDRs reutilizados por duas vezes. Colazo et al. (2004) não encontraram diferença estatística entre os grupos em termos de taxa de concepção após a IATF. Estes autores concluíram que a utilização de CIDR reutilizado por uma vez apresenta taxas de concepção similares ao uso do CIDR novo, mas que porém dispositivos reutilizados por 2 vezes apresentam menores taxas de concepção se comparado ao uso de CIDR novo ou reutilizado por uma vez. Por outro lado, outros pesquisadores

observaram que maiores níveis de progesterona circulante durante a fase de crescimento da onda folicular podem produzir oócitos mais viáveis (MIHM et al., 1994; REVAH; BUTTLER, 1996), e consequente maior taxa de concepção (FONSECA et al., 1994; XU et al., 1997). Portanto, os resultados do presente experimento, sugerem que os níveis de progesterona atingídos durante o uso do CIDR usado durante o protocolo de IATF não foi suficientemente baixo para afetar a fertilidade dos oócitos.

Cerri et al. (2005), utilizando vacas de leite de alta produção, comparou a concentração de progesterona circulante em animais tratados com dispositivos intravaginais novos ou usados (previamente utilizados por 7 dias). Cerri e colaboradores observaram um efeito significativo do tipo de dispositivo, sendo que os animais tratados com dispositivos re-utilizados apresentaram menores concentrações circulantes de P4 a partir do segundo dia após a inserção dos dispositivos intravaginais. Portanto, os diferentes níveis de P4 circulantes podem ter afetado a dinâmica folicular (CARVALHO et al., 2008), provavelmente modificando o padrão de liberação de LH durante o período do implante. Neste sentido, muitos autores descreveram o aumento da pulsatilidade do LH em animais com menores concentrações circulantes de P4 (KINDER et al., 1996; KIM et al., 2003). Ainda, a maioria dos trabalhos relacionando à liberação de LH em diferentes épocas do ano, em geral, a maioria dos experimentos observaram que animais sob estresse térmico apresentam pulsos de LH de menor amplitude e frequência; porém outros estudos não encontraram estes resultados (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Uma das razões para essa menor liberação de LH pode estar relacionada ao bloqueio dos pulsos de GnRH e LH em animais sob estresse e com altas concentrações de corticosteróides no sangue (GILAD et al., 1993). Ainda, foi relatado que animais sob estresse térmico apresentam menor ingestão de matéria seca, o que pode aumentar o balanço energético negativo e diminuir a liberação de LH (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Assim, frente aos dados do período do verão no presente estudo, podemos especular que os menores níveis de P4 circulantes nos animais do grupo CIDR usado podem ter proporcionado aumento na freqüência dos pulsos de LH e, consequentemente, na taxa de crescimento folicular. Isto pode ter proporcionado folículos ovulatórios de maior tamanho nos animais tratados com CIDR reutilizados se comparado com animais tratados com CIDR novos. Desta forma, como descrito em por muitos autores em vacas de corte (PERRY et al., 2005)

e leite (LOPES et al., 2007; SOUZA et al., 2007), animais com folículos ovulatórios maiores normalmente tem maiores taxas de concepção se comparado com animais que ovulam folículos menores. Porém, mais experimentos são necessários para confirmar o possível benefício de menores concentrações de P4 durante protocolos de IATF em vacas de leite sob estresse térmico. Apesar da possibilidade de reutilização do CIDR em protocolos de IATF, devido a aspectos de biosegurança, um cuidado especial deve ser tomado na higienização de dispositivos intravaginais reutilizados devido à possibilidade de transmissão de doenças.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que, em vacas holandesas de alta produção sincronizadas tanto no verão quanto no inverno, o uso de cipionato de estradiol no final do protocolo não melhorou as taxas de concepção, contrariando a hipótese inicial deste experimento. Verificou-se que o uso do CIDR previamente utilizado por 8 dias pode ser uma boa opção em protocolos de IATF que associam BE e dispositivos intravaginais para sincronizar a onda folicular em vacas de leite de alta produção. Mais experimentos são necessários para se verificar a repetibilidade destes achados e possíveis explicações fisiológicas que podem determinar o sucesso deste tipo de tratamento hormonal.

CAPÍTULO IV

Variações no momento da IATF e da aplicação do GnRH na dinâmica folicular e taxa de concepção em vacas de leite

1 HIPÓTESES

As principais hipóteses desta série de dois experimentos são: Experimento 4) O atraso na aplicação do GnRH de 48h para 56h e da IATF 16h após o GnRH melhora a taxa de concepção em vacas de alta produção; Experimento 5) A taxa de concepção é similar entre o grupo tratado com GnRH 48h e IATF 56h após a retirada do CIDR (4 manejos) comparado com o grupo tratado com GnRH no momento da IATF (56h após a retirada do CIDR; 3 manejos); e Experimento 4 e 5) A taxa de concepção será similar após o uso do CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias.

2 OBJETIVOS

- Comparar o efeito da aplicação do GnRH (48h vs 56h vs Controle-sem GnRH) e do tipo de CIDR (novo vs usado) no tamanho do folículo ovulatório e no momento de ovulação após a retirada do CIDR (Fase 1 - Experimento 4: dinâmica folicular).

- Comparar o efeito do atraso na aplicação do GnRH (48h vs 56h) em vacas holandesas de alta produção inseminadas em tempo fixo 16h após o GnRH (Fase 2, Experimento 4).

- Comparar o efeito da aplicação de GnRH 48h após a retirada do CIDR (4 manejos) ou no momento da inseminação (3 manejos) na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção (Experimento 5).

- Comparar a taxa de concepção entre o dispositivo intravaginal novo (sem prévia utilização) ou usado (previamente utilizado por 8 dias) na taxa de concepção de vacas holandesas de alta produção (Experimento 4 e 5).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANEJO

As unidades experimentais utilizadas foram vacas holandesas em lactação (Dinâmica follicular, Experimento 4 - fase 1, n = 68; Teste de fertilidade a campo, n = 199 no Experimento 4; n = 185 no Experimento 5). A média de dias em lactação no D0 e média de produção durante o D0 e D8 dos animais no Experimento 4 e Experimento 5 foram, respectivamente, de 219,3 ± 8,6 dias e 32,2 ± 0,5 Kg/dia; e de 223,5 ± 8,3 dias e 31,2 ± 0,5 Kg/dia. Ambos os experimentos foram realizados em 1 rebanho leiteiro sob sistema confinado do tipo *Free-stall* (Figura 1), localizado no estado de São Paulo (fazenda Santa Rita – Descalvado, São Paulo). O período experimental foi de Setembro a Novembro de 2007 (Experimento 4); e de Novembro de 2007 a Janeiro de 2008 (Experimento 5). A dieta de todos os animais era constituída, principalmente, a base de silagem de milho e concentrado de milho e soja. A dieta foi balanceada para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos para vacas holandesas em lactação (NRC, 2001). Todas as recomendações de boas práticas de manejo com relação ao bem estar animal foram criteriosamente respeitadas durante todo o período experimental.

Figura 1 - Detalhe dos animais utilizados no experimento (*Free Stall* - Fazenda Santa Rita – Descalvado, São Paulo)

3.2 HORMÔNIOS UTILIZADOS

Dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR contendo 1,38 g de P4; Pfizer) novo (sem prévia utilização) e usado (previamente utilizado por 8 dias). Benzoato de estradiol (2 mg; Estrogin; Pharmavet). Prostaglandina F2α (25 mg; Lutalyse; Pfizer). Cipionato de estradiol (1 mg; ECP; Pfizer). Gonadotrofina Coriônica Equina (400 UI; Folligon; Intervet). GnRH (100 mcg; Fertagyl; Intervet). Todos os tratamentos hormonais exceto o dispositivo intravaginal foram realizados por via intramuscular.

3.3 PROTOCOLOS HORMONAIS UTILIZADOS

Todos os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (Estrogin) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) no D0. Sendo que metade dos animais recebeu dispositivos de progesterona previamente utilizados por 8 dias. No

dia da retirada do dispositivo de P4 (D8), todas as vacas receberam um tratamento com PGF2α (25 mg, Lutalyse) e eCG (400 UI, Folligon).

3.3.1 **Experimento 4 - fase 1: Dinâmica folicular (Controle – sem aplicação de GnRH X GnRH 48h X GnRH 56h)**

Todos os animais (n = 68) receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (Estrogin) e um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) no D0. Sendo que metade dos animais recebeu dispositivos de progesterona novos e a outra metade recebeu dispositivos previamente utilizados por 8 dias. No dia da retirada do dispositivo de P4 (D8), todas as vacas receberam um tratamento com PGF2α (25 mg, Lutalyse) e eCG (400 UI, Folligon). No D8, os animais foram homogeneamente divididos em 3 grupos: G1) Controle, sem adição do indutor de ovulação – GnRH; G2) GnRH48h, receberam o indutor de ovulação 48h após a retirada do CIDR; G3) GnRH56h, receberam o indutor de ovulação 56h após a retirada do CIDR. Nesta, fase de dinâmica folicular os animais receberam exames ultra-sonográficos frequentes (probe linear de 7,5 Mhz, Aloka SSD-900V, Aloka Co., Wallingford, CT) a partir de 48h após a retirada do CIDR e a cada 12h até a detecção da ovulação ou até 180h após a retirada do CIDR (Delineamento Experimental da Dinâmica folicular Figura 2).

3.3.2 **Experimento 4 – fase 2: Teste de fertilidade a campo – tratamento com GnRH 48h ou 56h após a remoção do CIDR e IATF 16h após o GnRH**

No Experimento 4, os animais foram homogeneamente divididos em um delineamento fatorial 2 x 2 em 4 grupos no D8: G1) CIDR novo + GnRH 48h após retirada do CIDR; G2) CIDR usado + GnRH 48h após retirada do CIDR; G3) CIDR novo + GnRH 56h após retirada do CIDR; G4) CIDR usado + GnRH 56h após retirada do CIDR. Todos os animais foram inseminados em tempo fixo 16h após a aplicação do GnRH (Delineamento Experimento 4 - Figura 3). As taxas de

concepção foram verificadas por meio de exames ultra-sonográficos 30 e 60 dias após a inseminação.

3.3.3 Experimento 5: Teste de fertilidade a campo – tratamento com GnRH 48h (4 manejos) ou no momento da IATF (3 manejos)

No Experimento 5, os animais foram homogeneamente divididos em um delineamento fatorial 2 x 2 em 4 grupos no D8: G1) CIDR novo + GnRH 48h após retirada do CIDR; G2) CIDR usado + GnRH 48h após retirada do CIDR; G3) CIDR novo + GnRH 60h após retirada do CIDR; G4) CIDR usado + GnRH 60h após retirada do CIDR. Todos os animais foram inseminados em tempo fixo 60h após a retirada do CIDR (Delineamento Experimento 5 - Figura 4). As taxas de concepção foram verificadas por meio de exames ultra-sonográficos 30 e 60 dias após a inseminação.

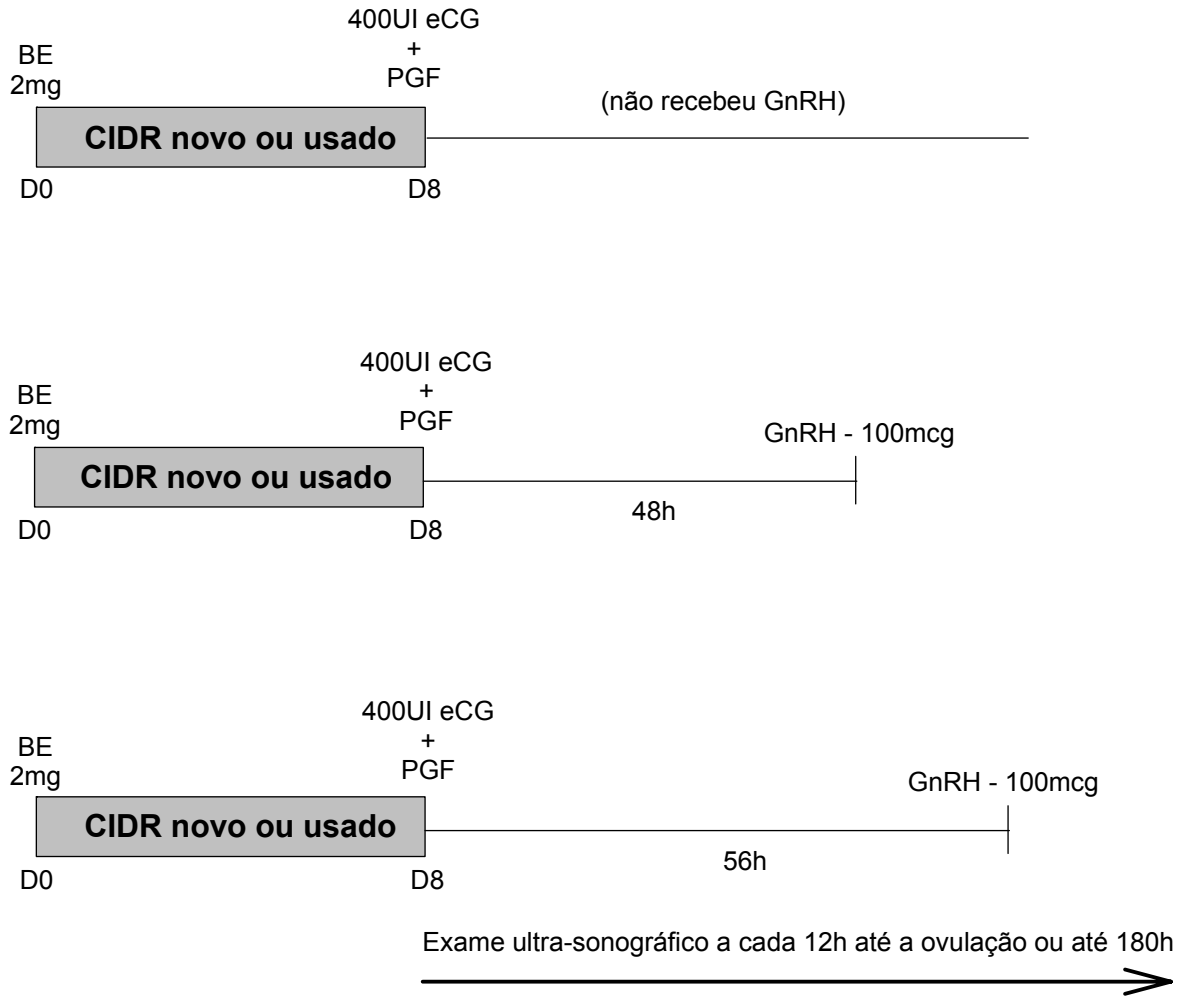


Figura 2 - Experimento 4 - fase 1, Dinâmica folicular. Delineamento experimental (fatorial 2 X 3; tipo de CIDR X Controle vs GnRH 48h vs GnRH 56h)

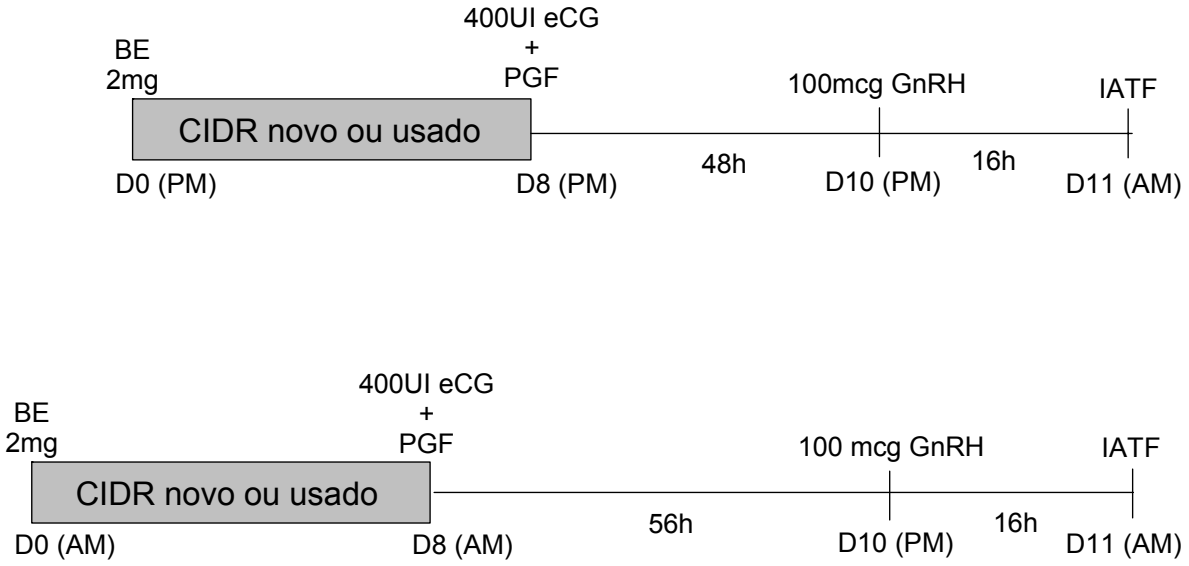


Figura 3 - Experimento 4 – fase 2. Teste de fertilidade a campo: Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X GnRH 48h vs GnRH 56h). A inseminação em tempo fixo foi realizada 16h após a aplicação do GnRH

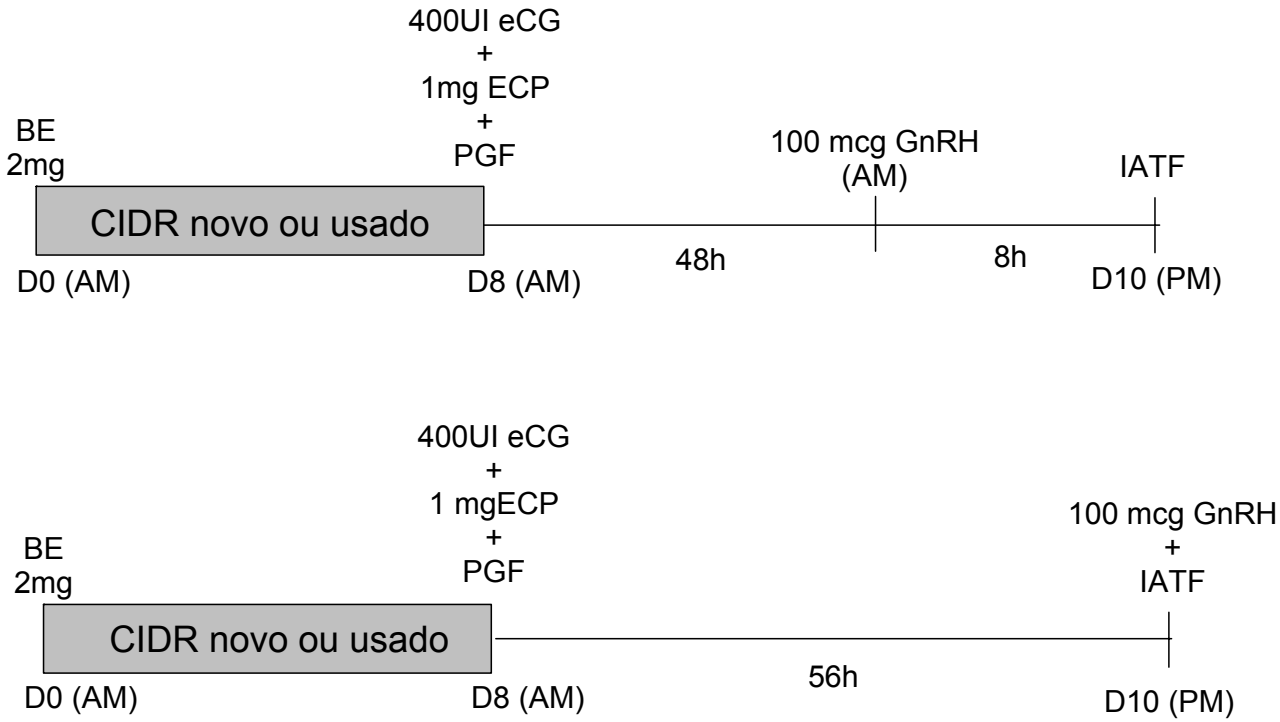


Figura 4 - Experimento 5. Teste de fertilidade a campo: Delineamento experimental (fatorial 2 X 2; tipo de CIDR X GnRH 48h vs GnRH no momento da IATF)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o proc MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). Os dados binomiais foram analisados com o proc GLIMMIX do SAS (Version 9,1 for Windows; SAS Inst., Cary, NC), e a unidade experimental “vaca” foi incluída no modelo estatístico como variável de efeito aleatório. As informações de dias em lactação, número de inseminações prévias e número de lactações de cada animal, assim como suas interações, foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo de regressão logística final foram removidas as

variáveis por backward elimination baseado no critério de Wald para $P > 0,20$. Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências. Todos os dados estão expressos como medias ± erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTO 4, FASE 1 – DINÂMICA FOLICULAR

Não houve interação entre o tipo de CIDR e o momento do tratamento de GnRH em nenhuma variável estudada (P > 0,10). As variáveis produção de leite, dias em lactação e número de partos não afetaram o tamanho do folículo ovulatório, o número de duplas ovulações e o momento das ovulações. Dentre as causas de falha de ovulação (n = 13), foi encontrado que apenas 3 animais não possuíam um folículo maior ou igual a 10 mm. Portanto, a grande maioria dos animais possuía estruturas ovulatórias maiores ou iguais a 10 mm no momento do tratamento com GnRH. Verificou-se luteinização com ausência de ovulação que em 5 dos 10 animais que possuiam folículos grandes (> 10 mm) no momento do tratamento com GnRH (Figura 5). Todas as estruturas não ovulatórias continuaram crescendo por pelo menos 96h após a retirada do CIDR.

Em geral, o tamanho do folículo ovulatório, o momento da ovulação, e a variação no momento da ovulação foram menores no grupo GnRH 48h se comparado com os grupos GnRH 56h e controle. Não houve diferença na taxa de ovulação entre os grupos, porém a análise dos efeitos principais indicou tendência de maior número de duplas ovulações após a utilização de CIDR novo se comparado ao CIDR usado (Tabela 1).

O efeito principal da distribuição do momento das ovulações após a retirada do CIDR conforme o tratamento com GnRH (48h x 56h x Controle-sem GnRH) está representada na figura 6. Fica claro que o atraso da aplicação do GnRH de 48h para 56h causa atraso na ovulação. Verificou-se alta concentração de ovulações ocorrendo entre 72 às 84h após a retirada do CIDR para o grupo GnRH 48h e entre 84 e 96h para o grupo GnRH56h. Também, é evidente a grande variação no momento das ovulações quando nenhum tipo de indutor exógeno é utilizado para sincronizar o pico de LH. No grupo controle, não foi encontrada correlação significativa (r = 0,06; P = 0,20) entre o nível de produção e o momento das ovulações.

Tabela 1 - Taxa de ovulação, diâmetro máximo do folículo ovulatório (cm) após a retirada do CIDR (média ± erro padrão da média), momento da ovulação (h) após a retirada do CIDR (média ± erro padrão da média) e porcentagem de duplas ovulações

	n	TX OVUL (%)	∅ FO MAX (cm)	MOM. OVUL. (h)	DUPLA OVUL. (%)
CIDR novo + GnRH48h	14	78,6	1,62 ± 0,12 [a]	73,6 ± 1,8 [ax]	36,4
CIDR novo + GnRH56h	13	84,6	1,84 ± 0,10 [b]	80,2 ± 4,5 [by]	27,3
CIDR novo + sem GnRH	8	62,5	1,85 ± 0,09 [b]	87,6 ± 16,2 [cz]	40,0
CIDR usado + GnRH48h	13	84,6	1,69 ± 0,08 [a]	76,9 ± 2,5 [abx]	18,2
CIDR usado + GnRH56h	12	75,0	1,71 ± 0,06 [a]	79,3 ± 4,7 [aby]	22,2
CIDR usado + sem GnRH	8	100	1,74 ± 0,09 [ab]	120,0 ± 13,5 [dz]	12,5
Efeitos principais					
CIDR novo	35	77,1	1,75 ± 0,07	78,9 ± 3,5 [a]	33,3 [B]
CIDR usado	33	84,8	1,71 ± 0,04	90,0 ± 5,5 [b]	17,9 [A]
GnRH 48h	27	81,5	1,65 ± 0,07 [a]	75,3 ± 1,6 [ax]	27,3
GnRH56h	25	80,0	1,78 ± 0,07 [b]	79,8 ± 3,2 [by]	25,0
Sem GnRH	16	81,3	1,78 ± 0,07 [b]	107,5 ± 11,0 [cz]	23,1

[a,b,c] Médias diferem estatísticamente; P < 0,05.
[x,y,z] Desvios padrão diferem estatísticamente; P < 0,05.

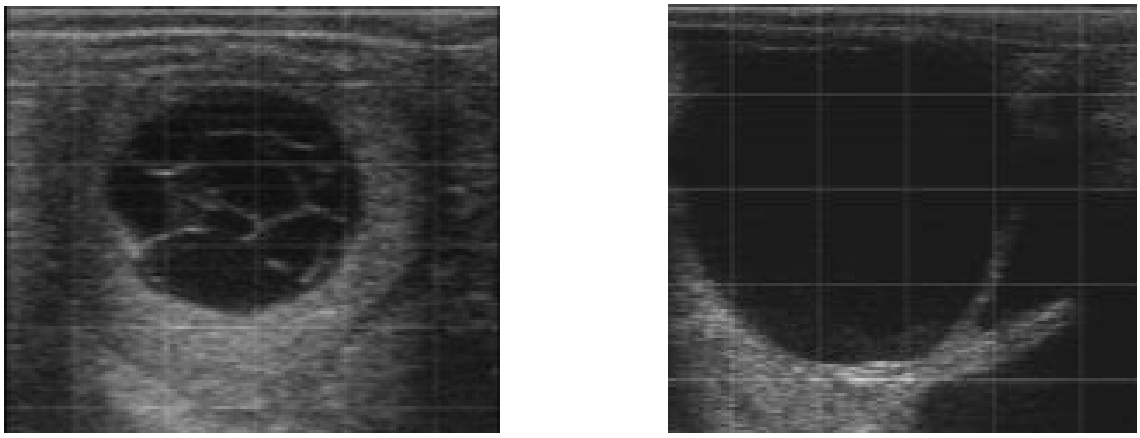


Figura 5 - Aspecto de imagem ultra-sonográfica 7 dias após a retirada do CIDR de 2 animais que não ovularam após ao final do protocolo hormonal. A) Folículo luteinizado com presença de linhas ecogênicas internas (à esquerda); B) Aspecto de ovário cístico – folículo anovulatório sem luteinização (à direita)

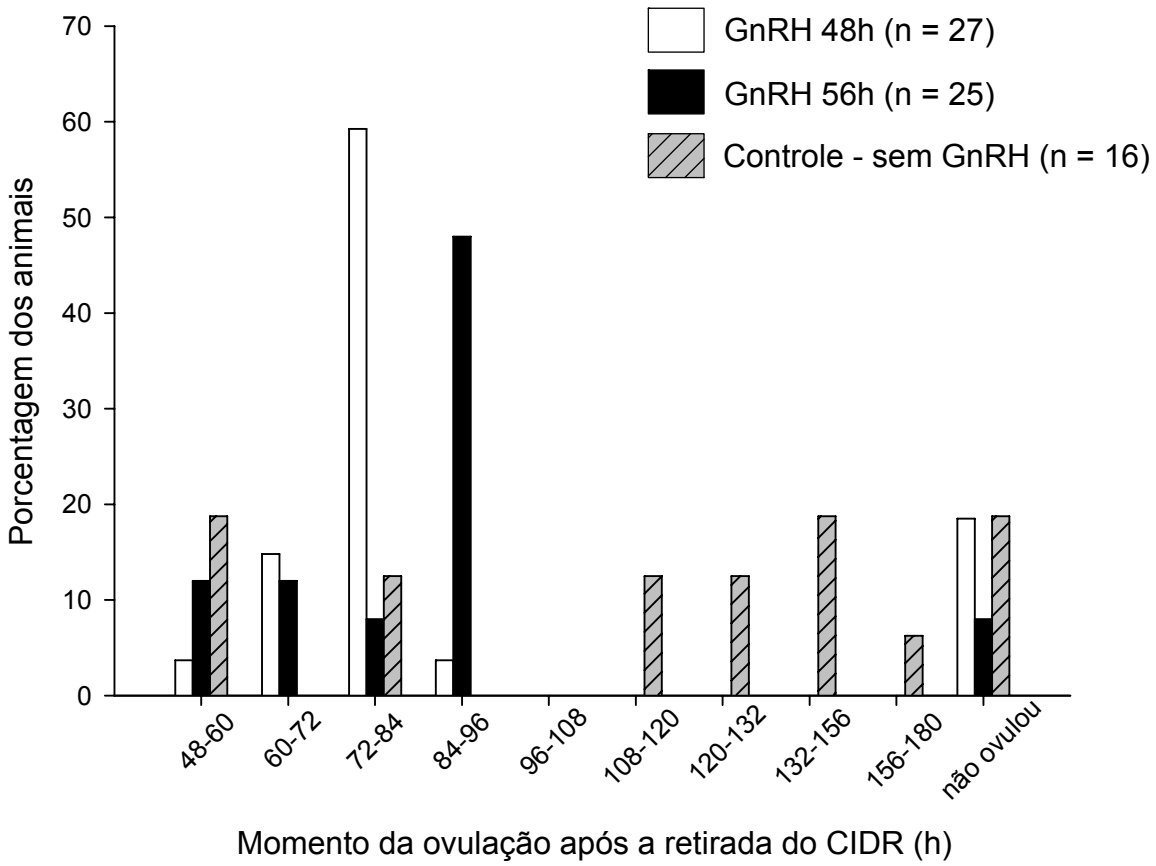


Figura 6 - Distribuição do momento das ovulações após a retirada do CIDR para os grupos GnRH 48h, GnRH 56h e Controle – sem GnRH

4.2 RESULTADOS EXPERIMENTO 4, FASE 2 – CIDR NOVO VS USADO X GNRH 48H OU 56H (IATF 16H APÓS O GNRH)

Não houve efeito da presença de CL no momento da inserção do CIDR (P = 0,28), da produção de leite (P = 0,87), e dos dias em lactação (P = 0,93) na taxa de concepção. Além disso, não foi verificada interação significante entre o tipo de CIDR e presença de CL no D0 (P = 0,19) na taxa de concepção. Houve tendência de interação entre o tipo de CIDR e o nível de produção dos animais (maior ou menor que a média) na taxa de concepção aos 30 (P = 0,07) mas não aos 60 (P = 0,54) dias após a IATF. O número de partos dos animais afetou a taxa de prenhez aos 30

dias após a IATF, sendo que vacas primíparas apresentaram maiores (P = 0,03) taxa de concepção que vacas multíparas (36,5% vs. 23,5%). Porém, esta diferença entre taxa de concepção para animais primíparos e multíparos somente tendeu (P = 0,15) a ser significante aos 60 dias após a IATF (primíparas = 31,7% vs. multíparas = 21,3%). Não houve interação entre o tipo de CIDR e momento de aplicação do GnRH (P = 0,98). Assim, ao contrário do esperado, os efeitos principais mostraram que os diferentes momentos de aplicação do GnRH não afetaram as taxas de concepção aos 30 e 60 dias após a IA. Todavia, o tipo de CIDR afetou a taxa de concepção aos 30 e 60 dias; sendo que os animais tratados com dispositivos novos apresentaram maiores taxas de concepção (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com aplicação de GnRH 48h ou 56h após a retirada do CIDR (fatorial 2 x 2). Todos os animais foram inseminados 16h após a aplicação de GnRH

Tratamento	**n**	**TC* D30 (%)**	**TC* D60 (%)**
CIDR novo e GnRH 48h	44	36,4	31,8
CIDR usado e GnRH 48h	52	21,1	17,3
CIDR novo e GnRH 56h	51	33,3	31,4
CIDR usado e GnRH 56h	52	21,2	19,2
		Efeitos principais	
GnRH 48h	96	28,1	24,0
GnRH 56h	103	27,2	25,2
CIDR novo	95	34,7 [a]	31,6 [a]
CIDR usado	104	21,2 [b]	18,3 [b]

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/número total de IAs)
[a,b] Médias diferem estatisticamente; P < 0,05.

4.3 RESULTADOS EXPERIMENTO 5 – CIDR NOVO OU USADO X GNRH 48H (4 MANEJOS) OU GNRH 56H (3 MANEJOS; GNRH APLICADO NO MOMENTO DA IATF)

Não houve interação (P = 0,60) entre o tipo de CIDR e o momento do tratamento com GnRH no resultado de taxa de concepção. Não houve interação entre o tipo de CIDR e a presença de CL nos ovários no D0 (P = 0,13). Da mesma forma, a presença de CL no D0 (P = 0,99), a produção de leite (P = 0,20), número de partos (P = 0,24) e o número de dias em lactação dos animais (P = 0,34) não afetou a taxa de concepção após os tratamentos hormonais. Além disso, os testes de fertilidade a campo não indicaram nenhuma diferença em termos de taxa de concepção entre os grupos tratados com GnRH 48h ou no momento da IATF (56h). Inesperadamente, foi encontrado efeito do tipo de dispositivo utilizado nos protocolos hormonais. Assim, foi verificado que as taxas de concepção no grupo que recebeu CIDR novo foram significativamente maiores que no grupo que recebeu CIDR previamente utilizado por 8 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após IATF em vacas holandesas de alta produção tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias com aplicação de GnRH 48h ou 56h após a retirada do CIDR (fatorial 2 x 2). Todos os animais foram inseminados 56h após a retirada do CIDR

Tratamento	**n**	**TC* D30 (%)**	**TC* D60 (%)**
CIDR novo e GnRH 48h	41	41,5	41,5 [a]
CIDR usado e GnRH 48h	49	18,7	10,2 [b]
CIDR novo e GnRH 56h	48	29,2	27,1
CIDR usado e GnRH 56h	47	14,9	14,9
		Efeitos principais	
GnRH 48h	90	28,9	24,4
GnRH 56h	95	21,9	20,1
CIDR novo	89	34,8 [a]	33,7 [a]
CIDR usado	96	16,7 [b]	12,5 [b]

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/número total de IAs)
[a,b] Médias diferem estatisticamente; P < 0,05.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram associados os resultados de dinâmica folicular e os resultados de dois experimentos de fertilidade a campo para tentar maximizar taxas de concepção em vacas de leite tratadas com protocolos hormonais para IATF.

Como o esperado o atraso na aplicação do GnRH atrasou o momento das ovulações sincronizadas. Porém este atraso foi de cerca de apenas 5h. Provavelmente, mais animais no grupo GnRH 56h apresentaram um pico de LH e ovulação devido a estímulos endógenos, como sugere a distribuição das ovulações apresentadas na figura 6. Os dados são indicativos de que cerca de 20% dos animais ovulam antes de 72h após a remoção do CIDR. Portanto, cerca de 20% dos animais apresentam pico de LH devido à cascata endógena desencadeada pelo estradiol folicular e não pelo GnRH exógeno. Outro fator que deve ser levado em conta nos cálculos dos momentos das ovulações, é o fato de que o intervalo dos exames ultra-sonográficos para se verificar a ocorrência da ovulação foi de 12h. Provavelmente, se estes intervalos fossem menores é possível que a diferença no intervalo médio até a ovulação sincronizada entre os grupos GnRH48h e GnRH56h fosse maior que 5 horas.

Alguns pesquisadores relataram aumentos na taxa de concepção com o atraso na aplicação do último GnRH do protocolo Ovsynch de 48h para 56h após a aplicação de PGF2α em vacas de leite de alta produção (BRUNSVEEN et al., 2006; VERAS et al., 2007). Estes pesquisadores argumentam que este aumento na concepção pode estar relacionado com maior tamanho do folículo ovulatório, melhora na taxa de ovulação, maiores concentrações circulantes de estradiol no pró-estro e maiores concentrações de progesterona no diestro. Porém, no presente estudo, não foi verificado melhora na taxa de concepção após a utilização desta mesma estratégia de atrasar aplicação de GnRH e da IATF. Uma das razões que pode ter influenciado nos resultados esta relacionada com o intervalo inseminação-ovulação. Por exemplo, analisando os dados da dinâmica folicular do Experimento 4, o tempo médio entre a IA e a ovulação foi de aproximadamente 11h para o grupo GnRH 48h e de apenas 8h para o grupo GnRH 56h. Segundo pesquisas anteriores (DRANSFIELD et al., 1998) o tempo ideal entre a inseminação e ovulação é de cerca de 12 a 15h. Assim, provavelmente uma maior porcentagem dos animais no

grupo GnRH 56h recebeu a inseminação muito tardiamente e muito próxima da ovulação.

Outra diferença crucial entre os experimentos com atraso de GnRH no protocolo Ovsynch e os experimentos do presente estudo foi a utilização de eCG no momento da remoção do dispositivo de progesterona nos protocolos descritos no presente estudo. É possível que uma maior pré-exposição do folículo aos efeitos da eCG posssam ter causado diminuição da viabilidade oocitária. Como descrito anteriormente, a eCG possui ação de LH e FSH quando aplicado em bovinos (MURPHY et al., 1991). Assim, estes maiores níveis séricos de LH podem ter causado uma exposição excessiva do oócito ao LH, a maturação prematura do oócito e a ovulação de oócitos envelhecidos (AUSTIN et al., 1999). Neste sentido, Austin et al. (1999) observaram que o período máximo de dominância folicular de modo a se evitar a formação de um folículo envelhecido foi de 8 dias. Assim, como a onda folicular se inicia ao redor do quarto dia, quando quando se utiliza dispositivos de progeterona e benzoato de estradiol, é possível que o atraso no momento de aplicação do GnRH de 48h para 56h seja benéfico em protocolos de IATF que utilizam dispositivos de progesterona e injeções de estradiol sem a aplicação de eCG no momento da retirada do dispositivo.

As falhas de ovulação observadas nos animais do presente estudo ocorreram em sua maioria (~ 77%) em animais apresentando folículos maiores que 10mm depois de 48h após a retirada do CIDR e, portanto, com eventual capacidade ovulatória (SARTORI et al., 2001). Metade destes folículos grandes (5/10) apresentou luteinização após a retirada do CIDR, com subsequente formação de estruturas císticas luteinizadas apresentando grandes cavidades (> 20 mm) e com linhas ecogênicas internas. Este tipo estrutura pode ser claramente observado por ultra-sonografia 5 a 7 dias após a retirada do CIDR. A outra metade dos animais com estruturas foliculares grandes não ovulatórias permaneceram com estas estruturas após o tratamento com GnRH, porém as mesmas não apresentaram nenhum sinal de luteinização, mesmo uma semana após a retirada do CIDR (Figura 5). Existem inúmeras causas relacionadas à falha de ovulação e formação de estruturas císticas em bovinos de leite (PETER, 2004). Porém, estudos mais detalhados serão necessários para elucidar as causas fisiológicas deste fenômeno.

No Experimento 5, a aplicação de GnRH 48h após a retirada do CIDR ou no momento da IATF apresentaram taxas de concepção similares. O intervalo médio

entre a inseminação e a ovulação foi de cerca de 15h para o grupo GnRH48h e de 20h para o grupo que recebeu GnRH no momento da IA. Este último intervalo está um pouco acima do ideal recomendado por pesquisas anteriores (DRANSFIELD et al., 1998). Desta forma, a alta qualidade do sêmen quando se utiliza aplicação de GnRH no momento da IATF se torna fator primordial, pois os espermatozóides terão que estar preparados para fertilizar o oócito por um tempo relativamente maior. Portanto, a utilização do GnRH no momento da IATF parece uma boa opção de manejo, pois economiza um manejo durante a sequência de injeções do protocolo, porém maiores cuidados devem ser tomados quanto à qualidade do sêmen a ser utilizado na IATF.

Ao contrário dos resultados apresentados no capítulo 3, os achados presentes no Experimento 4 e do Experimento 5 indicam que os animais tratados com CIDR novo apresentaram melhores taxas de prenhez se comparados aos animais que receberam um dispositivo CIDR de segundo uso. A porcentagem de animais sem presença de CL no D0 (~ 30 a 40% dos animais sincronizados) e o nível de produção de leite (~ 30 kg/dia) foram similares em todos os 3 experimentos que compararam a taxa de concepção entre o CIDR novo e usado desta presente tese. Portanto, o presente estudo e o estudo do capítulo III não nos permite concluir definitivamente se a eficiência do uso de dispositivos intravaginais de segundo uso é menor em animais de maior produção, mas seguramente nos permite afirmar que a taxa de concepção é mais varável se comparado ao uso de dispositivos novos. Porém, como descrito anteriormente, menores concentrações de progesterona circulante podem causar aumento da pulsatilidade do LH (KINDER et al., 1996; KIM et al., 2003). Fonseca et al. (1983) e Xu et al. (1997) encontraram que maiores concentrações plasmáticas de progesterona no momento da aplicação de PGF2α em protocolos de IATF estão associadas com maiores taxas de concepção em bovinos. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de que maiores concentrações de progesterona durante a fase de crescimento folicular produzem oócitos de melhor qualidade (MIHM et al., 1994; REVAH; BUTTLER, 1996). Portanto, é provável que os resultados do presente experimento possam ser explicados pelos mesmos mecanismos de controle da qualidade do oócito pelos níveis de progesterona circulante durante a fase de crescimento da onda folicular.

6 CONCLUSÕES

No Experimento 4, o atraso do GnRH de 48h para 56h em animais inseminados 16h após o GnRH não melhorou a taxa de concepção, contrariando a hipótese inicial deste experimento. Porém, em concordância com a hipótese apresentada no Experimento 5, a aplicação de GnRH no momento da IATF pode ser uma boa opção de manejo, o que possibilita um manejo a menos durante os procedimentos de tratamentos hormonais sem prejudicar as taxas de concepção. O tamanho do folículo ovulatório, assim como o tempo entre a IA e a ovulação foram maiores no grupo que recebeu o GnRH no momento da IA, confirmando a hipótese do presente experimento. Além disso, ao contrário da hipótese inicial, a taxa de concepção foi menor em animais tratados com CIDR usado comparado com animais tratados com CIDR novo.

IMPLICAÇÕES

Esta sequência de estudos teve como objetivo estabelecer um protocolo de IATF prático (apenas 3 manejos) e consistente em termos de taxa de concepção para vacas leiteiras de alta produção. Portanto, consideramos que os achados desta tese podem ser utilizados por produtores, pesquisadores e profissionais que trabalham em fazendas leiteiras com o intuito de melhorar a eficiência dos protocolos de IATF e, principalmente, estabelecer uma rotina reprodutiva a ser seguida sistematicamente na fazenda. Porém, o uso de protocolos de IATF e a manutenção do escore de condição corporal no pós-parto podem, isoladamente, não solucionar o problema da baixa eficiência reprodutiva em rebanhos leiteiros. Outros desafios para a pecuária leiteira no Brasil, e que podem evidentemente afetar a eficiência reprodutiva dos animais, parecem estar relacionados com volumosos de baixa qualidade, problemas sanitários e estresse térmico. Portanto, devido a estes e outros fatores que afetam a eficiência reprodutiva de fazendas leiteiras, temos que sistematizar a rotina reprodutiva (como acontece em uma sala de ordenha por exemplo) e monitorar - continuamente - os índices reprodutivos corretamente.

Assim, em fazendas de maior porte (mais de 300 animais em lactação), percebemos grandes vantagens em termos de logística, facilidade e acurácia na realização de tarefas (diagnóstico de gestação, aplicação de hormônios reprodutivos, etc) ao se trabalhar com rotinas reprodutivas mais agressívas e realizadas semanalmente. Devemos associar o uso da IATF com a rotina reprodutiva sistematizada: diagnósticos de gestação precoces e frequentes, observação de cio de retorno estratégica (18 a 30 dias após a IATF) e de preferência com o uso de dispositivos que indicam o comportamento de monta, entrada correta e diária de dados reprodutivos em softwares adequados, acurácia no treinamento do técnico envolvido na execução de toda a rotina reprodutiva (aplicação de hormônios corretos, no dose correta, para as vacas corretas, nos horários corretos).

O uso de protocolos de IATF + sistematização da rotina reprodutiva podem certamente ajudar o produtor de leite a aumentar a taxa de prenhez e manter os índices reprodutivos da fazenda em níveis adequados. Por exemplo, alguns índices reprodutivos a serem - realisticamente - buscados por produtores e técnicos seriam: mais que 90% dos animais devem receber a primeira IA pós-parto antes dos 100 dias em lactação; manter o intervalo médio entre inseminações menor que 40 dias;

taxa de serviço maior que 60%; taxa de concepção maior que 30%; taxa de prenhez maior que 18%; média de dias em lactação do rebanho menor que 190 dias; mais de 45% das vacas em lactação prenhez em todas as épocas do ano; mais de 50% das vacas prenhez até os 150 dias em lactação; intervalo entre partos menor que 13 meses.

Consideramos que os futuros experimentos para melhoria dos protocolos hormonais para bovinos leiteiros de alta produção devem focar o estabelecimento da dose ideal de benzoato de estradiol no dia da inserção do dispositivo/implante de P4, e de eCG no momento da retirada do dispositivo/implante de P4. Além disso, é provável que a utilização de GnRH + benzoato de estradiol no início de protocolos que utilizam dispositivo/implante de P4 usados (previamente usados por 8 dias ou eventualmente mais) possa melhorar a sincronização da emergência follicular e/ou aumentar as concentrações circulantes de P4 durante o período de implantação do dispositivo/implante de P4, de modo a aumentar a taxa de concepção. Baseados nos dados de dispersão de ovulações dos protocolos de IATF utilizados na presente tese, apesar dos custos e do aumento do manejo, a utilização de duas inseminações às 48h e 72h associado a aplicação de GnRH 56h após a retirada do dispositivo/implante de P4 pode resultar em melhoras significativas na concepção. Além disso, mais experimentos são necessários para elucidar os mecanismos fisiológicos responsáveis pelo aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro após o uso da eCG, assim como a possível formação de anti-corpos anti eCG e seus eventuais efeitos na concepção.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; BEAM, S. W.; BUTLER, W. R.; DEAVER, D. R.; DUBY, R. T.; ELDER, D.R.; FORTUNE, J. E.; GRIEL, L. C.; JONES, L. S.; MILVAE, R. A.; PATE, J. L.; REVAH, I.; SCHREIBER, D. T.; TOWNSON, D. H.; TSANG, P. C. W.; INSKEEP, E. K. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. **Journal Animal Sciencie**, v. 74, p. 1943-1952, 1996.

AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 1129-1135, 1995.

AHMADZADEH, A.; FALK, D. G.; MANZO, R.; SELLARS, C. B.; DALTON, J. C. Effect of incorporation of a low dose of estradiol cypionate (ECP) into a timed artificial insemination protocol on estrous behavior and conception rates in beef cattle. **Journal Animal Sciencie**, v. 81, p. 180, 2003.

ALILA, H. W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology Reproduction**, v. 31, p. 1015, 1984.

ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of the PMSG by fetal trofoblast cells. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 29, p. 313-316, 1972.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrous and fertility in heifers. **Journal Animal Sciencie**, v. 77, p. 2219-2226, 1999.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (Bos indicus) using GnRH, PGF2alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O.; RODRIGUES, C. A.; NASSER, L. F.; SILVA, R. C. P.; REIS, E. L.; SÁ FILHO, M. F. Efeito do tratamento com eCG conforme o escore de condição coporal na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 228, 2004a.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 82-83, 479-486, 2004b.

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

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Systematic reproductive management in dairy herds. **Proceedings of the New Zealand Veterinary Association Conference**, Christchurch, New Zealand, 2007.

BODIN, L.; DRION, P. V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIÉ, Y.; BECKERS, J. F. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, p. 651-660, 1997.

BOLAND, M. D.; CRODBY, T. F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v. 10, p. 175-180, 1978.

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFE, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Sciencie.**, v. 23, p. 263-271, 1990.

BOUSFIELD, G. R.; BUTNEV, V. Y.; GOTSCHALL, R. R.; BAKER, V. L.; MOORE, W. T. Structural features of mammalian gonadotropins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 125, p. 3-19, 1996.

BRUSVEEN, D. J.; CUNHA, A. P.; SILVA, C. D.; CUNHA, P. M.; STERRY, R. A.; SILVA, E. P. B.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Effects on conception rates of lactating dairy cows by altering the time of the second GnRH and AI during Ovsynch. **Journal of Dairy Sciencie**, v. 89, p. 150, 2006.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v. 60, p. 647-658, 2003.

BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal Dairy Sciencie**, v. 72, p. 767-783, 1989.

CARVALHO, J.; CARVALHO, N.; REIS, E.; NICHI, M.; SOUZA, A.; BARUSELLI, P. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus×Bos taurus, and Bos taurus heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W.; FITZPATRICK, L. A. Synchonization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in Bos indicus cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 801-814, 1997.

ÇELIK, H. A.; AYDIN, Y.; SENDAG, S.; DINÇ, D. A. Number of follicular waves and their effect on pregnancy rate in the cow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 87-92, 2005.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; SANTOS, J. E. P. Progesterone (P4) concentrations and ovarian response after insertion of a new or 7-d used intravaginal P4 insert (IPI) in proestrus lactating cows. **Journal Dairy Scincie**, v. 88, p. 37, 2005. Supplement, 1.

CERRI, R. L.; SANTOS, J. E.; JUCHEM, S. O.; GALVAO, K. N.; CHEBEL, R. C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal Dairy Sciencie**, v. 87, p. 3704-3715, 2004.

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, p. 855-865, 2003.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MARTÍNEZ, M. F.; WHITTAKER, P. R.; WILDE, R.; AMBROSE, J. D.; CORBET, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. **Theriogenology**, v. 61, p. 1115-1124, 2004a.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; WHITTAKER, P. R.; GAVAGA, Q. A.; WILDE, R.; MAPLETOFT, R. J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animals Reproduction Sciencie**, v. 81, p. 25-34, 2004b.

COLE, H. H.; HART, G. H. Potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, v. 93, p. 57-58, 1930.

COWLEY, S. M.; HOARE, S.; MOSSELMAN, S.; PARKER, M. G. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 19858-19862, 1997.

CRITSER, J. K.; ROWE, R. F.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J. Embryo transfer in cattle: factors affecting superovulatory resposnse, number of transferible embryos, and length of post-treatment estrous cycle. **Theriogenology**, v. 13, p. 397-406, 1978.

DAELS, P. F.; ALBRECHT, B. A.; MOHAMMED, H. O. Equine Chorionic Gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. **Biology Reproduction**, v. 59, p. 1062-1068, 1998.

DAXENBERGER, A.; IBARRETA, D.; MEYER, H. H. D. Possible heath impact of animal oestrogens in food. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 340-355, 2001.

DOLDI, N.; BASSAN, M.; FUSI, F. M.; FERRAI, A. In controlled ovarian hyperstimulation, steroid production, oocyte retrieval, and pregnancy rate correlate with gene expression of vascular endothelial growth factor. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, p. 589-592, 1997.

DOLDI, N.; BASSAN, M.; MESSA, A.; FERRAI, A. Expression of vascular endothelial growth factor in human luteinizing granulosa cells and its correlation with the respose to controlled ovarian hyperstimulation. **Gynecologicaln Endocrinology**, v. 11, p. 263-267, 1997.

DRANSFIELD, M. B. G.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1874-1882, 1998.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 207-215, 2001.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal Dairy Sciencie**, v. 72, p. 68-78, 1989.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. Superovulating cows with FSH and PMSG. **Theriogenology**, v. 9, p. 529-534, 1978.

FREETLY, H. C.; FERRELL, C. L. Net uptakes of oestradiol-17β and progesterone across the portal-drained viscera and the liver of ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 141, p. 353-358, 1994.

FONSECA, F. A.; BRITT, J. H.; MCDANIEL, B. T.; WILK, J. C.; RAKES, A. H. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. **Journal Dairy Sciencie**, v. 66, p. 1128-1147, 1983.

GADDUM-ROSSE, P. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. **American Journal fo Anatomy**, v. 160, p. 333-345, 1981.

GALVAO, K. N.; SANTOS, J. E.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L.; COSCIONI, A. C.; VILLASENOR, M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **Journal Animals Sciencie**, v. 82, p. 3508-3517, 2004.

GANSWORTHY, P. C.; TOPPS, J. H. The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. **Animals Prodution**, v. 35, p. 113-119, 1982.

GILAD, E.; MEIDAN, R.; BERMAN, A.; GRABER, Y.; WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **Journal Reproduction Fertility**, v. 99, p. 315-321, 1993.

GINTER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O. J.; DEL CAMPO, C. H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: areas of close apposition between the ovarian artery and vessels which contain uterine venous blood in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 11, p. 1387-1393, 1973.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal Associations among Pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-$PGF_{2\alpha}$, Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle. **Biology Reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

GONZALES, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T. D.; MURPHY, B. D.; MAPLEOTOFT, R. J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 158-162, 1994.

GONZALEZ-MENICO, F.; MANNS, J.; MURPHY, B. D. FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. **Animals Reproduction Sciencie**, v. 1, p. 137-144, 1978.

GOSPODAROWICS, D. Purification and physiochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). **Endocrinology**, v. 91, p. 101-106, 1972.

GÜMEN, A.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 86, p. 3184-3194, 2003.

GUSTAFSSON, J. A. New insits in oestrogen receptor (ER) research – the ERβ. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 16, 2000.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N. B.; WICHTELL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L.; PFEIFFER, D. U. The effect of estradiol benzoate administration on estrus response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, v. 45, p. 775-785, 1996.

HART, L. L.; DAVIE, J. R. The estrogen receptor: more than the average transcription factor. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, p. 335-341, 2002.

HAWK, H. W. Hormonal control of changes in the direction of uterine contractions in the estrous ewe. **Biology Reproduction**, v. 12, p. 423-430, 1975a.

HAWK, H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal Dairy Sciencie**, v. 70, p. 1487-1503, 1987.

HAWK, H. W.; COOPER, B. S. Improvement of sperm transport by the administration of estradiol to estrous ewes. **Journal Animal Sciencie**, v. 41, p. 1400-1406, 1975b.

HIXON, J. E.; FLINT, A. P. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 alpha secretion in sheep. **Journal Reproduction Fertility**, v. 79, p. 457-467, 1987.

HUMBLOT, P.; GRIMARD, B.; RIBON, B.; KHIREDDINE, B.; DERVISHI, V.; THIBIER, M. Source of variation of postpartum cyclicity, ovulation and pregnancy rates in primiparous charolais cows treated with Norgestomet implants and PMSG. **Theriogenology**, v. 46, p. 1085-1096, 1996.

JAINUDEEN, H. R.; HAFEZ, E. S. E.; GOLLMICK, P. D.; MOUSTAFA, L. F. Antigonadotropin in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. **American Journal of Veterinay Research**, v. 27, p. 669-675, 1966.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; MONTANO, M. M.; EDIGER, T. R.; SUN, J.; EKENA, K.; LAZENNEC, G.; MARTINI, P. G.; MCINERNEY, E. M.; DELAGE-MOURROUX, R.; WEIS, K.; KATZENELLENBOGEN, J. A. Estrogen receptors: selective ligants, partners, and distinctive pharmacology. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 55, p. 163-193, 2000.

KIM, S.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H. Different effects of subnormal levels of progesterone on the pulsatile and surge mode secretion of luteinizing hormone in ovariectomized goats. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 141-145, 2003.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal Animals Sciencie**, v. 74, p. 1424-1440, 1996.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2α. **Journal Endocrinology,** v.170, p. 369-380, 2001.

KOHEN, P.; CASTRO, O.; PALOMINO, A.; MUNOZ, A.; CHRISTENSON, L. K.; SIERRALTA, W.; CARVALHO, P.; STRAUSS, J. F.; DEVOTO, L. The Steroidogenic response and corpus luteum expression of the steroidogenic acute regulatory protein after human chorionic gonadotropin administration at different times in the human luteal phase. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 3421-3430.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFFSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciencie of he United States of America**, v. 93, p. 5925-5930, 1996.

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, p. 913-921, 1999.

KYLE, S. D.; CALLAHAN, C. J.; ALLRICH, R. D. Effect of progesterone on the expression of estrus at the first postpartum ovulation in dairy cattle. **Journal of Dairy Sciencie**, v. 75, p. 1456-1460, 1992.

LAMMOGLIA, M. A.; SHORT, R.E.; BELLOWS, S. E.; BELLOWS, R. A.; MACNEIL, M. D.; HAFS, H. D. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2α. **Journal Animals Sciencie**, v. 76, p. 1662-1670, 1998.

LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; HACKETT, A. J.; AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S. Influence of estradiol-17 beta on fertility in confined sheep inseminated with frozen semen. **Journal Animals Sciencie**, v. 51, p. 911-916, 1980.

LEGARDINIER, S.; CAHOEAU, C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity: lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 255-259, 2005.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W.; WOLFINGER, R. D. **SAS System of Mixed Models.** Cary, NC: Statistical Analysis System Institute, 1996.

LOPES, A. S.; BUTLER, S. T.; GILBERT, R. O.; BUTLER, W. R. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 99, p. 34-43, 2007.

LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; WILLIAMS, J.; PANCARCI, S. M.; THATCHER, M. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate for timed insemination. **Journal Dairy Sciencie**, v. 83, p. 216, 2000.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 81, p. 209-223, 2004.

LYIMO, Z. C.; NIELEN, M.; OUWELTJES, W.; KRUIP, T. A. M.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Relationships among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 53, p.1783-1795, 2000.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 33, p. 1-25, 1993.

MACMILLAN, K.L.; TAUFA, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal Reproduction Sciencie**, v. 21, p. 25-40, 1991.

MANN, G. E.; HARESIGN, W. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF2alpha release and luteal life span in anoestrous ewes. **Animal Reproduction Sciencie**,v. 67, p. 245-252, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Sciencie**,v. 64, p. 171-180, 2000.

MARAÑA, D.; CUTAIA, L.; PERES, L.; PINCINATO, D.; BORGES, L. F. K.; BÓ, G. A. Ovulation and Pregnancy rates in postpartum bos indicus cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate, with or without eCG and temporary weaning. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 116-117, 2006.

MARTINS, C M.; TORRES JR., J. R. S.; GIMENES, L. U.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Superovulação com eCG e FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 527, 2006.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas Nelore tratadas com cipionato ou benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. Annual Meeting of Brazilian Technology Society. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 285, 2005.

MARTINUK, S. D.; MANNING, A. W.; BLACK, W. D.; MURPHY, B. D. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 598-604, 1991.

MEE, M.; STEVENSON, J. S.; ALEXANDER, B. M.; SASSER, R. G. Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol- 17β, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and In vitro production of progesterone in dairy cows. **Journal Animal Sciencie**, v. 71, p. 185-198, 1993.

MENZER, C.; SCHAMS, D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in vivo studies. **Journal Reproduction Fertility**, v. 55, p. 339-345, 1979.

MIHM, M.; BAGUISI, A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v. 102, p. 123-130, 1994.

MOENTER, S. M.; CARATY, A.; KARSCH, F. J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v. 127, p. 1375-1384, 1990.

MOREIRA, F.; RISCO, C.; PIRES, M. F.; AMBROSE, J. D.; DROST, M.; DELORENZO, M.; THATCHER, W.W. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. **Theriogenology**, v. 53, p. 1305-1319, 2000.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27-43, 1991.

NEBEL, R. L.; JOBST, S. M.; DRANSFIELD, M. B.; PANDOLFI, S. M.; BAILEY, T. L. Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. **Journal Dairy Sciencie**, v. 80, p. 179, 1997.

NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, p.116-124, 2001.

NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academic Science, 2001.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal Animals Sciencie,** v. 68, p. 817-830, 1990.

ORIHUELA, P. A.; ORTIZ, M. E.; CROXATTO, H. B. Sperm migration into and through the oviduct following artificial insemination at different stages of the estrous cycle in the rat. **Biology Reproduction**, v. 60, p. 908-913, 1999.

PANCARCI, S. M.; JORDAN, E. R.; RISCO, C. A.; SCHOUTEN, M. J.; LOPES, F. L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal Dairy Sciencie**, v. 85, p. 122-1231, 2002.

PAPA, P. C.; MOURA, C. E. B.; ARTONI, L. P.; FATIMA, L. A.; CAMPOS, D. B.; MARQUES JR., J. E. B.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 379-389, 2006.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. L.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Conception rates in lactating Nelore cows treated with intravaginal progesterone device associated with estradiol benzoate or estradiol cypionate. Annual meeting of brazilian technology society. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 260, 2005.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. From the Cover: Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 102, p. 5268-5273, 2005.

PETER, A. T. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 1-7, 2004.

PETERS, K. E.; BERGFELD, E. G.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; GROTJAN, H. E.; HAMERNIK, D. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. 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, p. 1248-1254, 1994.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

REDMER, D. A.; DAIY, L. J.; CHARNOCK-JONES, D. S.; SMITH, S. K.; REYNOLDS, L. P.; ET AL. Characterization and experession of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. **Journal Reproduction Fertility**, v. 108, p. 157-165, 1996.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 106, p. 39-47, 1996.

ROELOFS, J. B.; BOUWMAN, E. G.; DIELEMAN, S. J.; VAN EERDENBURG, F. J.; KAAL-LANSBERGEN, L. M.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Influence of repeated rectal ultrasound examination on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 1337-1352, 2004.

RYAN, D. P.; PRICHARD, J. F.; KOPEL, E.; GODKE, R. A. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. **Theriogenology**, v. 39, p. 719-737, 1993.

SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; VIEL JR., J. O.; NICHI, M.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics in anestrous lactating Nelore treated with ear implant, eCG and GnRH.. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 235, 2004. Apresentado no Annual Meeting of Brazilian Technology Society.

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-17ß in dairy cattle. **Journal Dairy Sciencie**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

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

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. **Journal Dairy Sciencie**, v. 85, p. 2813-2822, 2002a.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal Dairy Sciencie**, v. 85, p. 2803-2812, 2002b.

SAS Institute. 2002-2003. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1 for Windows. SAS Ins., Cary, NC.

SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, p. 581-591, 1990.

SCHMITT, E. J. P.; BARROS, C. M.; FIELDS, P. A.; FIELDS, M. J.; DIAZ, T.; KLUGE, J. M.; THATCHER, W. W. A Cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. **Journal Animal Sciencie**, v. 74, p. 1915-1929, 1996.

SELLARS, C. B.; DALTON, J. C.; MANZO, R.; DAY, J.; AHMADZADEH, A. Time and incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a timed artificial insemination protocol. **Journal Dairy Sciencie**, v. 89, p. 620-626, 2006.

SENEDA, M. M.; BORSATO, E. A.; LUDWIG JR., H. E.; RUBIN, K. C. P.; SAUT, J. P. E.; BARREIROS, T. R. R. Relationship between ovulatory follicle size and conception rate in timed artificial insemination *Bos taurus* × *Bos indicus* heifers. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v 28, p. 137-142, 2004.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON JR., L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2α during luteolysis in ruminants. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 655-663, 1991.

SOUZA, A. H.; CUNHA, A. P.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Profiles of circulating estradiol after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 4, p. 224-232, 2005.

SOUZA, A. H.; GÜMEN, A.; SILVA, E. P. B.; CUNHA, A. P.; GUENTHER, J. N.; PETO, C. M.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Supplementation with estradiol-17β before the last gnrh of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal Dairy Sciencie**, v. 90, p. 4623-4634, 2007.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 314-316, 1997.

TYSSELING, K. A.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; HANSEN, P. J.; MIRANDO, M. A. Mechanisms regulating prostaglandin F2 alpha secretion from the bovine endometrium. **Journal Dairy Sciencie**, v. 81, p. 382-389, 1998.

URWIN, V. E.; ALLEN, W. R. Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids. **Journal Reproduction Fertility**, v. 32, p. 371, 1982.

VERAS, M. B.; LIMA. F. A.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; MAIO, J. R. G.; BARUSELLI, P. S. Atraso do último GnRH do protocolo Ovsynch (48 vs 56h após a PGF) na txa de prenhez de vcas holandesas de alta produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21., 2007, Costa do Sauípe, Salvador. **Anual…** Porto Alegre, RS : UFRGS, v. 35, p. 1125-1125, 2007.

XU, Z. Z.; BURTON, L. J.; MACMILLAN, M. L. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF2alpha and progesterone. **Theriogenology,** v. 47, p. 687-701, 1997.

WARD, D. N.; MOORE JR, W. T. Comparative study of mammalian glycoprotein hormones. In: ALEXANDER, N. J. (Ed.). **Animal models for research in fertility and contraception**. Baltimore: Harper and Row, 1979. p. 151.

WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; MCDANIEL, B. T.; MCALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal Dairy Sciencie**, v. 85, p. 244-251, 2002.

WILTBANK, M. C.; GUMEN A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-53, 2002.

WILTBANK, J. N.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combinations with gonadotrophins on the estrous cycle of beef heifers. **Journal Animal Sciencie**, v. 20, p. 341, 1961.

WILTBANK, J. N.; ZIMMERMAN, D. R.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **Journal Animal Sciencie**, v. 20, p. 990-994, 1965.

ZOLLERS, W. G.; GARVERICK, H. A.; SALFEN, B. E.; MOFFATT, R. J.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Receptor concentrations for progesterone and oxytocin in endometrial tissue from cows expected to have a short or normal oestrous cycle. **Biology Reproduction**, v. 44, p. 430, 1991.

ZOLLERS, W. G.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F. Oxytocin-induced release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in postpartum beef cows: comparison of short versus normal luteal phases. **Biology Reproduction**, v. 41, p. 262-267, 1989.