MARCOS VINÍCIUS DE CASTRO FERRAZ JÚNIOR

Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P_4 sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez

Pirassununga

2013

MARCOS VINÍCIUS DE CASTRO FERRAZ JÚNIOR

Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de PGF2 α sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P4 sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires

De acordo:

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO

33124

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.2802
FMVZ

Ferraz Júnior, Marcos Vinícius de Castro

Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de PGF_{2α} sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P₄ sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez / Marcos Vinícius de Castro Ferraz Júnior. -- 2013.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Alexandre Vaz Pires.

1. Sincronização da ovulação. 2. Prostaglandina F_{2α}. 3. Progesterona. 4. Ovulação dupla.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do efeito do benzoato de estradiol e da concentração de progesterona na taxa de ovulação e de gestação de novilhas leiteiras *Bos taurus indicus*, em um programa de IATF utilizando um protocolo OVSYNCH modificado", protocolado sob o nº 2332/2011, utilizando 300 (trezentos) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Evaluation of the effect of estradiolbenzoate and progesterone concentration in the rate of ovulation and pregnancy of dairy heifers *Bos taurus indicus*, in a program timed-AI using a modified OVSYNCH protocol", protocol number 2332/2011, utilizing 300 (three hundred) heifers, under the responsibility Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERRAZ JÚNIOR, Marcos Vinicius de Castro

Título: Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de PGF_{2α} sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P₄ sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

DATA: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me guia pelas sombrias e tortuosas veredas da existência e hoje que termino meu Mestrado, chego como um romeiro fatigado ao templo da ciência e não tenho senão lágrimas de gratidão a todos que me incentivaram.

Aos meus pais dedico essa conquista, produto de meus labores, constância, vigílias e dedicação.

Ao meu irmão, Matheus, amizade e simpatia.

Aos meus Avós e à minha Madrinha, respeito, amizade e gratidão.

À Márcia, desejo um futuro de flores.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, um voto de simpatia, respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho, reconhecimento e amizade.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), obrigado.

À Prof. Dr. Ivanete Susin e ao pessoal do capril, obrigado.

Aos amigos, Marcão, Evandro, Delci, José Alípio, Elizangela, Filipe, Ângelo, Vinícius, Renato, Daniel, Rodrigo, Ana Paula, desejo-lhes sorte.

À FEALQ e a Estação Experimental Agrozootécnica *Hildegard Georgina Von Pritzelwiltz*, (Fazenda Figueira), obrigado.

Aos amigos José Renato e Laísse, um abraço.

Aos amigos da Fazenda São Marcos, obrigado.

À FAPESP (processo 2011/16328-0), obrigado pela bolsa de estudo.

À FAPESP pelo financiamento do projeto processo 2012/01345-9.

Enfim, a todos que direta e/ou indiretamente auxiliaram na condução e elaboração deste trabalho.

*Meu muito obrigado e que
Deus lhes pague!*

Epígrafe

“Veja, se eu o enviar para dormir no meio dos lobos, seja esperto como as serpentes e inofensivo como os pombos”.

Jesus Cristo

RESUMO

FERRAZ JÚNIOR, M. V. C. **Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P_4 sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez.** [Pharmacological manipulation of the estrous cycle in Nelore cows: I - Effect of doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ for luteolysis on days 5 and 7 of the estrous cycle. II - Effect of replacement of GNRH by EB, in the 5Co-Synch program, at estrus detection and distribution, at ovulation rate and pregnancy rate]. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo do experimento I foi avaliar a luteólise causada por três doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5; 25 e 50 mg de Dinoprost tometamina) nos dias 5 e 7 do ciclo estral. Foram utilizadas 339 vacas não lactantes da raça Nelore. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a apresentação do estro, recebendo a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos dias 5 e 7 do ciclo estral. Cada grupo foi subdividido em três, que receberam os seguintes tratamentos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5 mg; 25 mg; 50 mg). Através da concentração de P_4 foram estimadas as taxas de regressão luteal 1 e 0,5 (1 - animais com concentração de P_4 abaixo de 1 ng/mL; 0,5 – animais com concentração de P_4 abaixo de 0,5 ng/mL). Não houve interação entre a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o dia do ciclo estral. A aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral apresentou maior taxa de regressão luteal 1 e 0,5 quando comparada com o dia 5 do ciclo estral (1 - 76,9 vs 37,0 % - $P = 0,0001$; 0,5 - 57,5 vs 21,7 %, $P = 0,0001$, respectivamente). A taxa de regressão luteal 1 aumentou de acordo com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada (12,5 mg – 39,0 %; 25 mg – 56,9 %; 50 mg – 76,5 % $P < 0,0001$). Quando a $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi administrada no dia 5 do ciclo estral a concentração média de P_4 seguiu o padrão de luteólise parcial e foi dependente da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Quando a $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi aplicada no dia 7 do ciclo estral a concentração média de P_4 caiu drasticamente de 0 para 24 h e não voltou a se elevar em 48 h. A concentração de P_4 em 48 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi menor na dose de 50 mg ($0,51 \pm 0,07$ ng/mL). A taxa de luteólise foi menor no dia 5 do ciclo estral comparado com o dia 7 do ciclo estral. À medida que a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi aumentada, a porcentagem de regressão luteal se elevou. O objetivo do

experimento II foi avaliar se a substituição das aplicações do GnRH por BE, ECP e eCG no protocolos de 5 dias de P₄ causa dupla ovulação e se a utilização de 1 ou 2 mg de BE no início do protocolo influencia na taxa de ovulação dupla. Foram utilizadas 85 multíparas da raça Nelore. No dia 0 do protocolo, as vacas receberam um implante de P₄ e a dose de BE segundo o tratamento pertencente (tratamento A – 1 mg de BE, tratamento B – 2 mg de BE). Cinco dias após, o dispositivo foi retirado e aplicou-se PGF_{2α}, ECP e eCG. Houve 5,9 % de dupla ovulação. O tratamento A causou menor porcentagem folículos maiores que 8 mm no dia 7 protocolo que o tratamento B (28,7 vs 50,6 P = 0,0460). Não houve diferença significativa na taxa de ovulação dupla, no diâmetro do folículo dominante no dia 5 e no dia 7 do protocolo e na taxa de crescimento folicular entre os tratamentos A e B. O protocolo de 5 dias de P₄ com BE, ECP e eCG causou uma baixa taxa de dupla ovulação. O objetivo do experimento III foi comparar o aparecimento e a frequência de estro e a taxas de ovulação e gestação entre os protocolos de 5 dias de P₄ + GnRH / GnRH e de 7 dias de P₄ + BE / ECP + eCG em nulíparas, primíparas e multíparas. Foram utilizadas 411 fêmeas da raça Nelore (nulíparas - n = 198; primíparas - n = 80; multíparas - n = 133). No protocolo de 7 dias de P₄, os animais receberam no dia 0 um implante de P₄ e BE. No dia 7, o dispositivo foi retirado e aplicou-se PGF_{2α}, ECP e eCG. No protocolo de 5 dias de P₄, os animais receberam no dia 0 o implante de P₄ e GnRH. No dia 5, o dispositivo foi retirado e aplicaram-se 2 doses de PGF_{2α} com intervalo de 6 h entre as doses de PGF_{2α}. Os animais que não apresentaram estro até a hora da IA receberam 100 µg de GnRH no momento da IA. A taxa de prenhez utilizando o protocolo de 5 ou 7 dias de P₄ variou de acordo com a categoria da fêmea (nulíparas - 41,0 vs 51,0 % - P = 0.1608; primíparas – 25,6 vs 31,7 % - P = 0,5513; multíparas - 58,4 vs 32,8 % - P = 0,0041, respectivamente). A taxa de apresentação de estro no protocolo de 7 dias de P₄ foi maior para todas as categorias de fêmeas quando comparado com o protocolo de 5 dias de P₄. (nulíparas – 95,8 vs 66,0 % - P <0,0001; primíparas – 48,7 vs 0 %; multíparas - 76,9 vs 13,4 % - P <0,0001, respectivamente). A resposta ao protocolo de 5 dias com GnRH foi pior nas multíparas.

Palavras-chave: Sincronização da ovulação. Prostaglandina F_{2α}. Progesterona.
Ovulação dupla.

ABSTRACT

FERRAZ JÚNIOR, M. V. C. **Pharmacological manipulation of the estrous cycle in Nelore cows: I - Effect of doses of PGF_{2α} for luteolysis on days 5 and 7 of the estrous cycle. II - Effect of replacement of GNRH by EB, in the 5Co-Synch program, at estrus detection and distribution, at ovulation rate and pregnancy rate.** [Manipulação farmacológica do ciclo estral em vacas Nelore: I – Efeito de doses de PGF_{2α} sobre a luteólise nos dias 5 e 7 do ciclo estral. II – Efeito da substituição do GNRH pelo BE nos protocolos de 5 dias de implante de P₄ sobre o tempo de aparecimento e distribuição do estro, na taxa de ovulação e na taxa de prenhez]. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The objective of the experiment I was to evaluate the luteolysis caused by three doses of PGF_{2α} (12.5, 25 and 50 mg of Dinoprost tometamina) when applied on the 5th and 7th days of the estrous cycle. Three hundred thirty-nine (339) non-lactating Nelore cows were used. The animals were divided into two groups according to the onset of estrus, and received the PGF_{2α} dose on the 5th or 7th day of the estrous cycle. Each group was divided into three subgroups, which were submitted to the treatments of PGF_{2α} with dose of 12.5 mg, 25 mg or 50 mg. Through the P₄ concentration, the rates of 1 and 0.5 luteal regression were estimated (1 - animals with P₄ concentration below 1 ng/mL and 0.5 - animals with P₄ concentration below 0.5 ng/mL). There was no interaction between the PGF_{2α} dose and the day of the estrous cycle. The PGF_{2α} application on the 7th day of the estrous cycle had higher rates of the 1 and 0.5 luteal regression, when compared to the PGF_{2α} application on the 5th day of the estrous cycle (1 - 76.9 vs 37.0 % - P = 0.0001; 0,5 - 57.5 vs 21.7 %, P = 0.0001, respectively). The rate of 1 luteal regression increased with the PGF_{2α} dose (12.5 mg - 39.0 %; 25 mg - 56.9 %; 50 mg - 76.5 %, P < 0.0001). The average concentrations of P₄, when the PGF_{2α} was administered on the 5th day of the estrous cycle, follow the partial luteolysis standard that dependent on the PGF_{2α} dose. When the PGF_{2α} is applied on 7th day of the estrous cycle, the average concentration of P₄ drops dramatically from 0 to 24 h and it do not rise again in 48 h. The P₄ concentration is lower in the 50 mg (0.51 ± 0.07 ng/mL), 48 h after the PGF_{2α} application. The luteolysis rate was low on the 5th day of the estrous cycle. The luteal regression percentage increased with increase of the PGF_{2α} dose. The objective of the experiment II was to

evaluate whether the replacement of the GnRH applications by BE, ECP and eCG in the 5-day protocols of P₄ cause double ovulation and if the use of 1 or 2 mg of BE at the beginning of the protocol influences the double ovulation rate. Eighty-five (85) multiparous Nelore cows were used. On day 0 of the protocol, the cows received a P₄ implant and a dose of BE that depending on the treatment to which the cows belong (Treatment A - 1 mg of BE, treatment B - 2 mg of BE). Five days later, the device was removed and the PGF_{2α}, ECP and eCG were applied. In the experiment II, there was 6.5 % of double ovulation. There was no significant difference in the double ovulation rate, dominant follicle diameter on the 5th and 7th day of the protocols, and follicular growth rate between the treatments A and B. The 5-day protocol of P₄ with BE, eCG and ECP caused a low rate of the double ovulation, and there was no difference between 1 or 2 mg of BE to synchronize the follicular development wave. The objective of the experiment III was to compare the onset and frequency of estrus and the ovulation and pregnancy rates among the protocols of 5 days of P₄ with GnRH and 7 days of P₄ with BE, ECP and eCG in nulliparous, primiparous and multiparous. Four hundred eleven (411) Nellore females were used (nulliparous - n = 198; primiparous - n = 80; multiparous - n = 133). In 7-day protocol of P₄, the animals received an implant of P₄ and BE on day 0. On day 7, the device was removed and the PGF_{2α}, ECP and eCG were applied in the cows. In 5-day protocol of P₄, the animals received implants of GnRH and P₄ on the day 0. On day 5, the device was removed and two doses of PGF_{2α} were applied with interval of 6 h. The animals that did not show estrus until the AI time received 100 mg of GnRH at this moment. The pregnancy rate varied according to the female category in both protocols (nulliparous - 41.0 vs 51.0 % - P = 0.1608; primiparous - 25.6 vs 31.7 % - P = 0.5513; multiparous - 58.4 vs 32.8 % - P = 0.0041, respectively). The rate estrus onset in the 5-day protocol of P₄ with GnRH was lower for all female categories, when compared to the 7-day protocol (nulliparous - 95.8 vs 66.0 % - P <0.0001; primiparous - 0 vs 48.7 %; multiparous - 76.9 vs 13.4 % - P <0.0001, respectively). The response in the 5-day protocol with GnRH was worse in multiparous cows.

Keywords: Ovulation synchronization. Prostaglandin F_{2α}. Progesterone. Double ovulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos tratamentos utilizados no experimento.....	44
Figura 2 – Taxa de regressão luteal 1 e 0,5 (Reg1 e Reg05, respectivamente), de regressão parcial (Ret – considerando apenas as vacas que a concentração de P_4 chegou abaixo de 1 ng/mL em 24 h e em 48 h voltou a ficar acima de 1 ng/mL) e de estro em cada tratamento.....	46
Figura 3 – Distribuição de estro das vacas que receberam uma das 3 doses de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 ou 50 mg) nos dias 5 ou 7 do ciclo estral.....	47
Figura 4 – Diâmetro do CL na hora 0 (hora da administração de $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada.....	47
Figura 5 – Diâmetro do CL na hora 0 (hora da administração de $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada.....	48
Figura 6 – Taxa de regressão luteal 1 (concentração de P_4 abaixo de 1 ng/mL 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (dia 5 e 7 do ciclo estral) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada.....	49
Figura 7 – Taxa de regressão luteal 0,5 (concentração de P_4 abaixo de 0,5 ng/mL 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada.....	49
Figura 8 - Taxa de detecção de estro de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada.....	50
Figura 9 - Concentração de Progesterona (P_4) 0, 24 e 48 h após a administração de doses de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) nos dias 5 e 7 do ciclo estral.....	52
Figura 10 - Esquema do protocolo de sincronização utilizado no experimento I e II. Apenas os animais do experimento II passaram por inseminação artificial 55 h após a remoção do dispositivo de P_4	64
Figura 11 - Porcentagem de ovulação, de ovulação dupla e de estro nos tratamentos A e B (A – 1 mg de BE, B – 2 mg de BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular).....	66
Figura 12 - Distribuição do estro (n - número de animais) após a retirada do CIDR e porcentagem de gestação de acordo a manifestação	

do estro. A seta indica o horário (56 h) que os animais passaram por inseminação artificial	67
Figura 13 - Esquema dos protocolos de sincronização utilizados no experimento.....	75
Figura 14 - Concentração de progesterona (P_4) oito dias após a IA das fêmeas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado ($P = 0,0003$).....	78
Figura 15 – Distribuição do estro de acordo com os protocolos de 5 e 7 dias de progesterona.....	79
Figura 16 – Taxa de prenhez geral e nos protocolos de 5 e 7 dias de P_4 de acordo com o horário da inseminação artificial (55 e 72 h)	79
Figura 17 - Concentração de progesterona (P_4) oito dias após a IA das nulíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado ($P = 0,1215$).....	81
Figura 24 – Distribuição de estro das nulíparas	82
Figura 19 - Concentração de progesterona (P_4) oito dias após a IA das primíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado ($P = 0,0071$).....	84
Figura 20 – Distribuição do estro das primíparas submetidas aos protocolos de 5 e 7 dias de progesterona	85
Figura 21 - Concentração de progesterona (P_4) das multíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado ($P = 0,9705$)	87
Figura 22 – Distribuição do estro das multíparas submetidas aos protocolos de 5 e 7 dias de P_4	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem de ovulação à administração de GnRH, tamanho do folículo dominante (FD), tamanho do corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona (P_4) de acordo com o dia do ciclo estral.....	26
Tabela 2 - Distribuição dos animais nos tratamentos A e B nos experimentos (I e II), e de acordo com a presença de corpo lúteo (CL - sem e com) no momento da colocação do dispositivo de progesterona.....	63
Tabela 3 - Diâmetro do folículo dominante (FD) no dia 5 (D5 - dia da remoção do CIDR) e no dia 7 (D7) do protocolo de IATF de acordo com os tratamentos A e B (A – 1 mg de BE, B – 2 mg de BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular), bem como a taxa de crescimento por dia do folículo dominante.....	66
Tabela 4 - Caracterização dos animais que participaram do experimento.....	74
Tabela 5 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nos protocolos de 5 (5D) e 7 (7D) dias de progesterona	77
Tabela 6 - Concentração de Progesterona (ng/mL) oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P_4 . Concentração de P_4 em cada protocolo levando em consideração os animais que ovularam e que ficaram prenhes	77
Tabela 7 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro das nulíparas nos protocolos de 5 (5D) e 7 (7D) dias de progesterona.....	80
Tabela 8 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das nulíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P_4 . Concentração de P_4 em cada protocolo levando em consideração as nulíparas que ovularam e que ficaram prenhes ...	81
Tabela 9 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nas primíparas nos protocolos de 5 (5 D) e 7 (7 D) dias de progesterona.....	83
Tabela 10 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das primíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P_4 . Concentração de P_4 em cada protocolo levando em consideração as primíparas que ovularam e que ficaram prenhes	84

Tabela 11 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nas multíparas nos protocolos de 5 (5 D) e 7 (7 D) dias de progesterona	86
Tabela 12 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das multíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P ₄ . Concentração de P ₄ em cada protocolo levando em consideração as multíparas que ovularam e que ficaram prenhes	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
	Capítulo I.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS	20
2.1.1	Dinâmica Folicular em <i>Bos taurus indicus</i>	22
2.2	FASES DA IATF	24
2.2.1	Sincronização da onda de desenvolvimento folicular	24
2.2.1.1	Uso do GnRH para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular	25
2.2.1.2	Uso do estradiol para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular	26
2.2.2	Decréscimo da concentração de P₄ e início do pró-estro	27
2.2.2.1	Luteólise em protocolos de 5 dias de P ₄	28
2.2.3	Indução da ovulação.....	30
2.3	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	Capítulo II.....	41
3	EFEITO DE DOSES DE PROSTAGLANDINA F _{2α} EM VACAS NELORE NOS DIAS 5 E 7 DO CICLO ESTRAL	42
3.1	INTRODUÇÃO	42
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.3	RESULTADOS	45
3.4	DISCUSSÃO	53
3.5	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	Capítulo III.....	61
4	EFEITO DO PROTOCOLO DE 5 DIAS DE P ₄ + ECP + ECG SOBRE A TAXA DE OVULAÇÃO DUPLA EM VACAS NELORE.....	62
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.3	RESULTADOS	65
4.4	DISCUSSÃO	67
4.5	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	70
	Capítulo IV.....	72

5 EFEITO DA REDUÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À P ₄ UTILIZANDO OS PROTOCOLOS DE 5 DIAS DE P ₄ + GNRH E DE 7 DIAS DE P ₄ + BE + ECP E ECG	73
5.1 INTRODUÇÃO	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.3 RESULTADOS	76
5.3.1 Todos os animais.....	76
5.3.2 Nulíparas	80
5.3.3 Primíparas	82
5.3.4 Multíparas	85
5.4 DISCUSSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A Inseminação Artificial (IA) é a principal ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos comerciais (SÁ FILHO; VASCONCELOS, 2010). Dados de Silva (2007) corroboram com essa afirmação, pois este autor observou um aumento de 8 Kg no peso a desmama de bezerros provenientes de IA comparados à monta natural, aumento esse devido à genética superior introduzida no rebanho.

A IA em gado de corte torna-se uma técnica difícil de ser manejada em grande escala de produção, principalmente por ineficiências na detecção de estro, pois depende do elemento humano e os horários da técnica não coincidem com a jornada regular de serviço. Outro fato que explica a dificuldade da detecção de estro no Brasil, é o rebanho predominante *Bos taurus indicus* que apresentam estros curtos (geralmente inferior a 12 h) e poucos expressivos, com alta incidência no período noturno (30 a 50 %) (SÁ FILHO; VASCONCELOS, 2010). Em revisão, Sartori e Barros (2011) verificaram baixa taxa de detecção de estro em novilhas Nelore (menos de 50%), apesar da alta taxa de ovulação (76,7 %) após tratamento com PGF_{2α}. A média aceita da eficiência de detecção de estros em rebanhos leiteiros é de aproximadamente 50 % (BARR, 1975). Pesquisas que utilizaram leite e sangue para dosar progesterona, mostram que 5 a 30 % dos animais inseminados não estão em estro (SENGER et al., 1988).

Assim, um método eficiente para aumentar a taxa de serviço, é a utilização de tratamentos hormonais que sincronizam a ovulação, permitindo a IA em tempo fixo de um grupo de animais pré-determinado. Os tratamentos hormonais para controle da ovulação (controlar a fase folicular e lútea) são utilizados com sucesso em vacas e novilhas *B. taurus* e *B. indicus* (BARUSELLI et al., 2001).

Capítulo I

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS

A atividade ovariana da fêmea bovina é controlada por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotálamo - hipófise - ovários - útero e por mecanismos intra-ovarianos que estabelecem a dinâmica ovariana. Esse processo se dá pela ocorrência de ondas de desenvolvimento folicular que são grupos de folículos recrutados a se desenvolver (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum que dura em média 3 dias, atingindo o diâmetro folicular de 4 – 8 mm (MERTON et al., 2003).

Após a fase de recrutamento, ocorre a divergência folicular que se caracteriza por haver o desenvolvimento de apenas 1 folículo (folículo dominante) enquanto os outros entram em atresia (folículos subordinados). Dentro da onda folicular, três eventos são importantes: a emergência (recrutamento), a seleção (divergência) e a dominância folicular. As gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH) controlam esses eventos (DRIANCOURT, 2001).

A emergência folicular se caracteriza por apresentar um grupo de folículos crescendo simultaneamente no ovário, sendo esse crescimento estimulado pela liberação de FSH. Nesse momento, os folículos apresentam em torno de 4 mm de diâmetro, sendo responsivos e dependentes de altas concentrações de FSH, o que possibilita a proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica (GINTHER et al., 2002).

Ao atingir níveis máximos de concentração sérica, o FSH começa a regredir, dando início à fase de divergência folicular. O declínio do FSH é causado pelos próprios folículos, que produzem inibina A que, em um primeiro momento (2 primeiros dias), é o supressor mais importante do FSH. Em um segundo momento, o estradiol produzido pelo folículo dominante passa a exercer a função de inibir a liberação de FSH, fazendo com que os folículos subordinados entrem em atresia, uma vez que estes não conseguem se

desenvolver com baixas doses de FSH. O declínio da concentração de FSH é o ponto chave para a divergência folicular, uma vez que o folículo dominante consegue se desenvolver com a baixa concentração de FSH (GINTHER et al., 2002).

O LH também tem um papel na divergência folicular, uma vez que foi encontrada uma maior expressão de mRNA para receptores de LH em células da granulosa do folículo dominante, quando comparado aos subordinados antes do processo de divergência folicular, levando a crer que a expressão precoce de receptores para LH em células da granulosa seja também um ponto importante para o processo de seleção. Embora ainda não esteja claro o papel do LH na divergência folicular, está claro seu papel no crescimento e desenvolvimento do folículo dominante (BEG et al., 2001).

Acredita-se que o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I – *insulin growth factor-I*) tenha um papel importante no processo de divergência. Aparentemente há uma maior concentração de IGF-I no momento da divergência folicular, levando o folículo dominante a uma maior sensibilidade ao FSH, permitindo que a esteroidogênese continue em baixas doses de FSH até que o folículo seja responsivo ao LH. Acredita-se que o folículo dominante em bovinos consegue utilizar com sucesso as ações recíprocas entre as gonadotrofinas, IGF e estradiol, de modo a estimular seu crescimento e concomitantemente inibir o crescimento dos seus contemporâneos (SIQUEIRA, 2007).

Uma vez que houve a divergência folicular, caso exista no ovário um corpo lúteo ativo, este vai produzir altas concentrações de progesterona, o que vai tornar o folículo dominante anovulatório porque a progesterona (P_4) em altas doses suprime a pulsatilidade do LH, de modo que o folículo dominante entra em atresia, fazendo com que se inicie outra onda de desenvolvimento folicular. Os pulsos de LH têm o papel de fazer com que o folículo dominante termine seu processo de maturação e de desencadear a ovulação. Esse processo é determinado pelo aumento da produção de estrógeno que, em alta concentração, vai desencadear uma retroalimentação positiva para a secreção de GnRH, que vai culminar com a maior produção de LH, promovendo a ovulação. Os folículos que não ovularam, independentemente do motivo, entram em atresia. Esse processo dura em torno de 1 a 2 semanas. Diante

deste fato, ao se observar o ovário por ultrassonografia infere-se que, dos folículos visíveis, 85 % deles já estão em processo de atresia (MERTON et al., 2003).

2.1.1 Dinâmica Folicular em *Bos taurus indicus*

A sincronização da ovulação exige que seja bem compreendido os padrões de desenvolvimento folicular e os mecanismos hormonais que regulam a dinâmica folicular dos bovinos. O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas, e há particularidades entre o padrão de onda de desenvolvimento folicular em *Bos taurus taurus* e em *Bos taurus indicus*. Geralmente, *Bos taurus indicus* apresentam 3 ondas de desenvolvimento folicular enquanto que *Bos taurus taurus*, normalmente, apresentam 2 ondas de desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORI et al., 2001). Figueiredo et al. (1997) observaram a predominância de três ondas de desenvolvimento folicular em cerca de 65 % das novilhas Nelore e Sartori et al. (2001) encontraram que em novilhas Holandesas há predominância de duas ondas foliculares (cerca de 55,5 %).

Outro ponto que há diferença entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* é o momento da divergência folicular. Geralmente, novilhas *Bos taurus taurus* atingem a divergência com folículos maiores que *Bos taurus indicus* ($8,3 \pm 0,2$ mm e 5,4 a 6,2 mm, respectivamente) (SARTORI et al., 2004; SARTORELLI et al., 2005). No entanto, o intervalo entre a divergência e a ovulação é semelhante entre ambos os grupamentos genéticos (aproximadamente 2,7 dias, SARTORELLI et al., 2005), o que explica porque *Bos taurus indicus* ovula folículos com menor diâmetro quando comparado com *Bos taurus taurus*.

O tratamento de novilhas Nelore com LH resulta em ovulação de cerca de 30 % de folículos entre 7,0 e 8,4 mm, de 80 % em novilhas com folículos entre 8,5 a 10 mm e mais de 90 % em folículos com mais de 10 mm (GIMENES et al., 2008). Por outro lado, vacas Holandesas adquirem capacidade ovulatória com folículos maiores de 12 mm (SARTORI et al., 2001).

Outra diferença fisiológica entre novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* está relacionada ao diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular. Em *Bos taurus taurus* são descritos diâmetros de $15,2 \pm 0,3$ mm para a primeira onda folicular (SARTORI et al., 2004). Já em *Bos taurus indicus*, o diâmetro relatado é de $11,3 \pm 0,3$ mm (FIGUEIREDO et al., 1997). A partir desses relatos pode-se verificar que o diâmetro do folículo dominante e do folículo ovulatório em zebuínos é menor do que em taurinos.

Devido à ovulação de um folículo menor, *Bos taurus indicus* têm diâmetro do corpo lúteo (CL) menor quando comparado com *Bos taurus taurus*. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro (FIGUEIREDO et al., 1997) ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 a 25 mm (ADAMS et al., 1993; THATCHER et al., 1993). Embora haja na literatura uma correlação entre o tamanho do CL e a concentração de P_4 , Bastos et al. (2010) ao avaliarem as concentrações de P_4 em vacas Nelore e Holandesas secas sob mesmas condições climáticas e nutricionais, observaram que, mesmo após a ovulação de folículos menores (15,7 vs 13,4 mm), as concentrações de P_4 nos dias 7 (2,8 vs 2,0 ng/mL) e 14 (4,6 vs 4,1 ng/mL) do ciclo estral foram superiores em animais da raça Nelore. Assim, parece que a concentração de P_4 e o tamanho do folículo devem ser feitos dentro do mesmo grupo genético, além de avaliar se este folículo ovula de modo espontâneo ou se foi induzido a ovular.

Além das particularidades referentes à dinâmica folicular dos animais zebuínos, é importante fazer algumas considerações quanto às características do comportamento de cio e intervalo cio-ovulação, pois estes são parâmetros essenciais para a escolha do melhor momento da IA. Fêmeas *Bos taurus indicus* apresentam estro de duração mais curta, entre 10 a 12,9 h (PINHEIRO et al., 1998; BÓ et al., 2003) quando comparado as taurinas 16,3 h (BÓ et al., 2003). Somado a este fator, foi observado maior incidência de estro noturno, sendo que 53,8 % dos estros iniciou-se durante à noite e 34,6 % ocorreu apenas no período noturno (PINHEIRO et al., 1998).

Sartori e Barros (2011) verificaram baixa taxa de detecção de cio em novilhas Nelore (< 50 %; n=24), apesar da alta taxa de ovulação (76,7 %) após tratamento com $PGF_{2\alpha}$. Os autores concluíram que a falha na detecção de estro ocorreu devido a não expressão do estro nos animais submetidos à

detecção de cio durante 24 h por 7 dias. Esses fatores em conjunto dificultam o manejo e a eficácia de detecção de estro, principalmente na espécie *Bos taurus indicus*.

Pinheiro et al. (1998) verificaram que o intervalo entre o início do estro e a ovulação foi mais curto em novilhas Nelore ($26,6 \pm 0,4$ h) em relação a estudos anteriores com taurinos (28 a 32 h), como revisado por Bó et al. (2003). Entretanto, no estudo de Mizuta (2003), o intervalo cio-ovulação entre as duas raças não diferiu (Nelore $27,1 \pm 3,3$ h vs Angus $26,1 \pm 6,3$ h), apesar da diferença na duração do estro entre os dois grupos (Nelore $12,9 \pm 2,9$ h vs Angus $16,3 \pm 2,9$ h). Estas diferenças tornam a observação de estro um ponto ainda mais crítico a ser considerado na IA, aumentando a necessidade de tratamentos de sincronização que resultem em bons resultados.

2.2 FASES DA IATF

Para o sucesso dos protocolos de sincronização de ovulação, são necessários três passos básicos: 1º) a sincronização da onda de desenvolvimento folicular; 2º) o decréscimo da concentração de P_4 com o início do pró-estro e 3º) a indução da ovulação.

2.2.1 Sincronização da onda de desenvolvimento folicular

A sincronização da onda de desenvolvimento folicular tem como objetivo fazer com que todos os animais tenham folículos em estágios de desenvolvimento similares e conhecidos. Atualmente os dois protocolos hormonais mais utilizados para atingir esse objetivo são: 1) induzir a ovulação do folículo dominante via administração do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (PURSLEY et al., 1995) e 2) induzir a atresia folicular pela administração de estradiol associado a uma fonte de P_4 (BÓ et al., 1994). Protocolos que usam o estradiol + P_4 para a sincronização da onda de

desenvolvimento folicular são mais baratos e mais eficientes em vacas recém-paridas quando comparados com o GnRH (BARUSELLI et al., 2004).

2.2.1.1 Uso do GnRH para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular

O mecanismo pelo qual o GnRH induz a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular é baseado na indução da ovulação do folículo dominante, e o sucesso é dependente da presença de um folículo dominante com a capacidade de ovulação no momento da aplicação do GnRH. Isso é observado quando a vaca tem um folículo maior que 8,5 mm em *Bos taurus indicus* (GIMENES et al., 2008). Nas vacas que responderem à aplicação do GnRH, a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular começa com 2 dias após a aplicação do GnRH (BÓ et al., 2002).

A indução da ovulação em alta porcentagem de vacas tratadas com GnRH é um fator determinante para obter um resultado satisfatório, como mostrado em vacas de leite (VASCONCELOS et al., 1999). No entanto, a probabilidade de ovulação com o GnRH é mais baixa em vacas em anestro quando comparado com vacas cíclicas (FERNANDES et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2009a), pois o folículo se torna atrésico em um curto espaço de tempo após a aquisição da capacidade de ovular (WILTBANK et al., 2002).

A habilidade do primeiro GnRH em induzir a ovulação é dependente do estágio da onda de desenvolvimento folicular e da fase do ciclo estral (GEARY et al., 2000). O aumento da concentração de P_4 é associado à diminuição do pico de LH, induzido pela aplicação do GnRH, o que faz com que folículos maiores de 10 mm não ovulem (COLAZO et al., 2008).

A Tabela 1 ilustra bem a chance de ovulação ao GnRH de acordo com cada fase da ciclo estral. Os animais com baixas concentrações de P_4 e com um folículo dominante (> 10 mm) apresentam alta taxa de resposta ao primeiro GnRH, o que ocorre nos dias 5 e 18 do ciclo estral (MOREIRA et al., 2001). Isso porque a alta concentração de P_4 tem um efeito negativo em induzir o pico de LH quando se administra GnRH, diminuindo a resposta ovulatória (PERRY;

PERRY, 2009), pois a P_4 suprime a expressão de receptores para GnRH na hipófise, o que impede o pico de LH (NETT et al., 2002).

Tabela 1- Porcentagem de ovulação à administração de GnRH, tamanho do folículo dominante (FD), tamanho do corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona (P_4) de acordo com o dia do ciclo estral

Dia do ciclo	n	FD (mm)	CL (mm)	P_4 (ng/mL)	Ovulação (%)
2	5	4,6 ± 0,7	3,6 ± 1,1	0,8 ± 1,3	0
5	5	10,0 ± 0,7	19,9 ± 1,1	6,2 ± 1,3	100
10	4	12,5 ± 0,8	24,1 ± 1,2	14,1 ± 1,4	25
15	5	11,0 ± 0,7	20,0 ± 1,1	14,0 ± 1,3	60
18	5	12,2 ± 0,7	15,7 ± 1,1	1,6 ± 0,3	100

Fonte: (Adaptado de MOREIRA et al., 2000).

2.2.1.2 Uso do estradiol para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular

Diversas formas de estradiol (17 β -estradiol, benzoato de estradiol (BE), cipionato de estradiol (ECP) e valerato de estradiol) podem ser usadas para controlar os processos-chave do desenvolvimento folicular que são: a atresia folicular, a emergência folicular e a ovulação. Bó et al. (1995) demonstraram que a injeção de 17 β -Estradiol induziu a atresia do folículo dominante e a emergência de uma nova onda folicular 4,3 ± 0,2 dias depois, sendo esse intervalo, da aplicação do estradiol até a emergência da nova onda, independentemente do estágio de crescimento do folículo dominante no momento da aplicação do estradiol.

A capacidade do estradiol em induzir a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular depende de concentrações elevadas de progesterona na circulação sanguínea (BURKE et al., 1997). Neste trabalho, foi administrada uma dose de 1 mg de BE em vacas no dia 13 do ciclo estral, com ou sem aplicação de PGF_{2 α} às 0, 24 ou 48 h após a aplicação de BE. A emergência de uma nova onda folicular foi induzida em todos os animais que não receberam PGF_{2 α} e em todas as vacas (com exceção de uma) que

receberam PGF_{2α} 48 h após o BE. No entanto, em vacas que receberam PGF_{2α} 0 ou 24 h após o BE, não houve a sincronização do desenvolvimento folicular, mostrando que para a sincronização do desenvolvimento folicular é necessário concentrações altas de P₄ por, no mínimo, 48 h.

A explicação para o estradiol sincronizar o desenvolvimento folicular combinado com alta concentração sérica de P₄ é devido a mecanismos sistêmicos que envolvem o eixo gonadotrópico. O estradiol tem a capacidade de suprimir a secreção de FSH e a alta concentração de P₄ suprime a secreção pulsátil de LH, que poderia ser induzida pelo estradiol, causando assim uma supressão tanto de secreção de FSH quanto de LH, induzindo a atresia dos folículos independentemente da etapa de desenvolvimento folicular (GONG et al., 1996).

Segundo Burke et al. (2005) a administração de uma dose de BE tem como alvo primário a aromatase, enquanto outros sítios da via esteroidogênica são afetados de forma variável, cessando assim a esteroidogênese. Outro efeito observado foi erosão da membrana das células da granulosa no folículo dominante de animais tratados com BE, embora não tenham sido observadas diferenças na taxa de apoptose das células da granulosa em 36 h ou no sinal potencial de desencadeamento de apoptose em 24 h.

2.2.2 Decréscimo da concentração de P₄ e início do pró-estro

O segundo passo dos protocolos de sincronização da ovulação é o decréscimo na concentração de P₄ fazendo com que se inicie o pró-estro e o desenvolvimento do folículo ovulatório. Isso pode ser realizado mediante a aplicação de um agente luteolítico, como a PGF_{2α} ou seus análogos, tal como o Dinoprost trometamina ou o Cloroprostenol, nos animais que têm um CL ativo e através da remoção do implante de P₄. Em vacas em anestro, o tratamento com PGF_{2α} não é necessário, pois neste estágio fisiológico o animal não tem um CL funcional. No entanto, na prática sempre se usa a PGF_{2α}, mesmo nas vacas em anestro, pois na maioria das vezes os animais não são avaliados no início do protocolo.

Uma importante característica a ser considerada é o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ em protocolos que têm um CL com 5 dias, devido ao discutido efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em CLs desta idade (HENRICKS et al., 1974).

2.2.2.1 Luteólise em protocolos de 5 dias de P_4

Mais especificamente a luteólise em programas de IATF que usam o GnRH como sincronizador da onda de desenvolvimento folicular, há uma discussão sobre a efetividade de uma dose padrão de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em causar a luteólise do CL formado pela sincronização do desenvolvimento folicular (WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2011). O CL de vacas é refratário a uma dose única dose $\text{PGF}_{2\alpha}$ (25 mg de Dinoprost) durante a fase inicial (até o sexto dia do ciclo estral) (ROWSON et al., 1972; HENRICKS et al., 1974; BEAL et al., 1980). O GnRH no começo do protocolo faz com que o folículo ovule caso esteja nas fases de crescimento ou de dominância, formando um CL (THATCHER et al., 1989; MACMILLAN; THATCHER, 1991).

O resultado da sincronização do desenvolvimento da onda folicular com GnRH é um CL de 5,5 dias em protocolos (por exemplo o *Ovsynch*) com 7 dias de intervalo entre o primeiro GnRH e a luteólise e de 3,5 dias em protocolos que usam 5 dias de intervalo entre o GnRH e a luteólise (PURSLEY et al., 1995; WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012). No último caso, é consenso que uma única dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (25 mg de Dinoprot) não é efetiva (WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012). Já no caso dos protocolos com 7 dias, não há consenso entre os autores de qual a porcentagem de vacas que pode não sofrer luteólise completa (dependendo do estudo 5 a 40 %) (MOREIRA et al., 2000; GUMEN et al., 2003; BRUSVEEN et al., 2009; CUERVO-ARANGO et al., 2011).

A abordagem de aumentar o tempo de proestro, conforme sugere o protocolo 5dCo-Synch, já se mostrou eficiente em elevar a taxa de concepção dos programas de IATF (BRIDGES et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2009; WHITTIER et al., 2010). No entanto, uma das exigências do protocolo é que

haja uma luteólise do corpo lúteo que se encontre no início da fase lútea. Por isso, Bridges et al. (2008) utilizaram, em sua metodologia, duas aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com intervalo de 12 h, pois deste modo é possível induzir a luteólise do CL (95 - 100 %), que é formado após a indução da ovulação com a primeira dose de GnRH (ADAMS et al., 1994).

Em um programa de IATF, por questões de logística e custo, quanto menor for o manuseio com os animais e menor quantidade de hormônios, mais vantajoso ele se torna. Por isso, a aplicação da segunda dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ vem sendo discutida. Biehl et al. (2010) avaliaram três diferentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5; 25,0 e 50,0 mg de Dinoprost) em protocolos de 5 e 7 dias. O tratamento 5d12,5mg, apresentou taxa de detecção de estro e taxa de prenhez na IATF inferior aos tratamentos 7d25mg e 7d50mg, isto sugere que a resposta do CL à uma dose de 12,5 mg de Dinoprost no protocolo de 5 dias é questionável. Provavelmente esta quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não foi capaz de regredir por completo o CL. Porém, o tratamento 5d50mg apresentou valores semelhantes aos tratamentos recomendados pelo fabricante do dispositivo.

No entanto, Kasimanickam et al. (2009) encontraram taxa de concepção maior (69 % vs 54,3 % e 52,0 %) com 2 doses de Dinoprost ($\text{PGF}_{2\alpha}$) com um intervalo de 7 h entre elas, quando comparado com uma dose de Cloprostenol (análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$) ou $\text{PGF}_{2\alpha}$ em um protocolo 5dCo-Synch. A taxa de gestação do protocolo 5dCo-Synch em função do intervalo de tempo entre aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se mostra extremamente desuniforme (WHITTIER et al., 2010), podendo não ser um bom parâmetro para avaliar a luteólise em um programa de IATF. A mensuração da porcentagem de regressão luteal segundo dados de prenhez é complicada, uma vez que outros fatores como a ciclicidade do lote e resposta ao primeiro GnRH tem grande impacto nos resultados.

Em vacas, o controle do ciclo estral por meio de uma única dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ só acontece, com maior segurança, a partir do dia 6 do ciclo estral, porém antes deste período, conhecido como início da fase luteal, há muitas controvérsias das condições necessárias para que haja luteólise. Uma das abordagens é aumentar a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$, como pesquisado por Cuervo-Arango et al. (2011), que analisaram os efeitos de 50 mg de Dinoprost

aplicados 102 ± 6 h após a ovulação em 4 novilhas Holandesas, e encontraram taxa de luteólise de 50 %.

Valldecabres-Torres et al. (2012) testaram a dose normal (150 µg) e dose dupla (300 µg) de d-cloroprostenol em 4 momentos distintos (96, 108, 124 e 130 h após a ovulação) e, considerando que o prazo entre o início do estro e ovulação ocorre cerca de 28 horas (ALVES et al., 2003), pode-se dizer que os autores testaram as doses entre os dias 5 e 6,5 a partir do início do estro. Os autores também encontraram que, à medida que se aumenta a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$, aumenta-se a porcentagem de regressão luteal. No dia 6,5, os autores encontraram 60 % vs 80 % de regressão para dose simples e dupla, respectivamente.

2.2.3 Indução da ovulação

A indução da ovulação é o terceiro e último passo dos protocolos de IATF e tem como objetivo sincronizar a ovulação dos folículos pré-ovulatórios. A indução da ovulação pode ser realizada usando hormônios tal como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou LH que têm uma ação direta nos folículos, ou hormônios que induzem o pico de LH responsável pela ovulação, como o GnRH ou ésteres de estradiol. No entanto, por causa do intervalo entre a administração do hormônio e a variação da ovulação, deve ser dada uma atenção especial nos programas de IATF, de maneira a inseminar as vacas de acordo com o tempo de ovulação a partir da aplicação de cada hormônio.

2.2.3.1 Indução da ovulação com estradiol

Os dois principais ésteres de estradiol utilizados no Brasil para induzir a ovulação em protocolos de IATF são o BE e o ECP. No entanto, apesar dos dois hormônios promoverem um pico de LH, que induz a ovulação, há diferenças na sua farmacodinâmica. O BE induz um pico de LH mais precoce ($19,6 \pm 1,2$ h), com maior magnitude ($20,5 \pm 1,9$ ng/mL), no entanto com menor

duração ($8,6 \pm 0,2$ h), o que faz com que o BE tenha uma área sob a curva de ($158,6 \pm 26,1$ ng/mL/72). O ECP induz um pico de LH mais tardio ($50,5 \pm 3,6$ h), com menor magnitude ($9,4 \pm 2,2$ ng/mL), no entanto com maior duração ($16,5 \pm 1,0$ h), o que faz com que o ECP tenha uma área sob a curva de ($339,4 \pm 36,4$ ng/mL/72) (SALES et al., 2012).

Essa diferença de farmacodinâmica dos ésteres de estradiol é devido as características químicas do ECP, pois este é formado por esterificações do estradiol por ácido ciclopentano propiônico, resultando em baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, baixa liberação do local de administração, provocando uma atividade biológica prolongada comparada com o BE (VYNCKIER et al., 1990). O BE é responsável pela antecipação do pico de LH, devido sua maior solubilidade, o que causa o aumento da magnitude do pico de LH, mas por um período de tempo menor (SALES et al., 2012).

O conhecimento dessas diferenças é importante para determinar o melhor tempo de aplicação dos produtos, induzindo assim a ovulação no protocolo de IATF. Apesar das diferenças na farmacodinâmica dos dois hormônios, a indução e sincronização da ovulação com BE e ECP têm sido semelhantes quando se aplica o BE 24 h depois da aplicação do ECP (SALES et al., 2012). Meneghetti et al. (2009) também não encontraram diferença na taxa de prenhez de vacas tratadas com BE (50,8 %) 24 h depois da remoção do implante de P₄, ou ECP (51,9 %) no momento da retirada do implante de P₄. Neste estudo a taxa de ovulação também foi semelhante entre BE e ECP.

No entanto, quando se compara a utilização de BE no dia 8 (dia da retirada do implante de P₄), ou no dia 9 (24 h depois da retirada do implante) observa-se o deslocamento em 24 h no momento da ovulação (AYRES et al., 2008).

A aplicação de BE no dia da remoção do dispositivo de P₄ antecipou a ovulação, pois, como já mencionado, o BE induz um pico de LH em aproximadamente 16 h. Sendo assim, os autores compararam a IA em 54 e 48 h após a remoção do dispositivo de P₄ e encontraram que, quando o BE é aplicado no dia 8 e a IA é realizada em 48 h, a taxa de prenhez foi 24,5 % maior do que quando os animais foram IA em 54 h (AYRES et al., 2008).

O tempo ótimo para a IA deve ocorrer de acordo com a ovulação, pois é necessário que haja o encontro do espermatozoide e do óvulo enquanto ambos

estão viáveis. Vários experimentos têm demonstrado que 6 h é o tempo mínimo necessário para que ocorra todo o processo de capacitação do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea. No entanto, o pico de espermatozoides aptos a fecundar o óvulo ocorre entre 8 a 18 h após a IA (THIBAUT, 1973; WILMUT; HUNTER, 1984; HAWK, 1987). E o óvulo se encontra capaz de ser fertilizado apenas entre 6 a 10 h após a ovulação (BRACKETT et al., 1980). Dransfield et al. (1998) e Roelofs et al. (2005) demonstraram que a probabilidade de concepção cai quando a IA é realizada perto da hora da ovulação (menos que 12 a 6 h antes da ovulação). E segundo Roelofs et al. (2006), a fertilização do ovócito cai drasticamente quando a IA é realizada após a ovulação, justamente pela necessidade do tempo de maturação espermática antes da fertilização.

Ainda sugere-se que a indução da ovulação de um folículo imaturo pode levar a uma menor taxa de concepção e maior perda embrionária (PERRY et al., 2005). Este mesmo autor encontrou que, em protocolos de IATF, a indução da ovulação de folículos menores que 11 mm pode causar decréscimo na taxa de concepção e aumento na morte embrionária tardia e fetal. Estas perdas estão associadas a menor concentração de estradiol na circulação sanguínea no dia da IA, a baixa taxa de aumento da P_4 após a ovulação e ao decréscimo na concentração de P_4 na circulação sanguínea.

O folículo induzido a ovular com um menor diâmetro pode ter menor capacidade de produção de progesterona, uma vez que CL's provenientes desses folículos podem ter menos células luteais grandes, que são responsáveis por 80 % da P_4 produzida pelo CL, pois estas são provenientes da diferenciação de células da granulosa e não aumentam durante a fase luteal (PERRY et al., 2005).

A inseminação artificial deve ocorrer perto do período de ovulação para maximizar o acesso do espermatozoide ao óvulo, mas não tão tarde de modo que o óvulo já se encontre envelhecido (DALTON; SAACKE, 2007). O tempo ótimo para a realização da IA é entre 24 e 12 h antes da ovulação para uma maior taxa de fertilização e de 16-12 h para uma maior percentagem de embriões de qualidade superior (89 % de embriões recuperados; ROELOFS et al., 2006). Mais precisamente, Maatje et al. (1997) obtiveram uma taxa de prenhez ótima quando a IA realizada 16,2 h antes da ovulação.

No entanto, Dransfield et al. (1998) trabalhando com um número expressivo de animais ($n = 2661$), encontraram que as melhores taxas de concepção ocorrem quando a IA é realizada entre 24 a 16 h antes da ovulação. Estes resultados também podem ser explicados por uma elevada qualidade do sêmen, que teria uma viabilidade prolongada no trato genital após a IATF. Roelofs et al. (2006) sugeriram que a capacidade de fertilização dos espermatozoides não é diminuída quando a IA é realizada em até 36 h antes da ovulação, pois a taxa de fertilização não diferiu quando AI foi realizada entre 36 a 24 h antes da ovulação. A partir desta e de outras investigações, Dalton et al. (2001) demonstraram que a realização da IA relativamente precoce (até 36 h antes ovulação) não afeta nem a capacidade dos espermatozoides de fertilizar nem o número de espermatozoides que penetram o ovócito, quando se utiliza sêmen de alta qualidade.

2.3 CONCLUSÃO

O conhecimento da fisiologia reprodutiva de vacas avançou bastante nos últimos anos, esses conhecimentos evoluíram para o desenvolvimento de diversas técnicas de reprodução, como a IATF. Essa técnica possibilitou driblar o principal obstáculo do uso da IA, a observação do estro, pois conseguiu realizar a IA em um tempo determinado, sem a observação do estro. No entanto, os resultados desta técnica em gado de corte ainda podem ser melhorados. Exemplo disto são os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa do Doutor Michael L. Day, que demonstrou que o uso do dispositivo de P_4 por 5 dias melhorou os índices reprodutivos quando comparado com protocolo de 7 dias de P_4 , ambos protocolos utilizando $P_4 + GnRH$ (BRIDGES, et al., 2008). Outro fato que justifica essa afirmação é a grande variabilidade de resultados obtidos nos protocolos comumente utilizados no Brasil. O desafio é conseguir distinguir porque dessa variação de resposta em animais que, em teoria, seriam semelhantes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 1, p. 267-275, 1993.
- ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; BO, G. A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M. R.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n. 7, p. 1103–1113, 1994.
- BARR, H. L. Influence of estrous detection on days open in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 2, p. 246, 1975.
- BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O. Programas de inseminación artificial a tempo fijo en *Bos indicus*. Primeira parte. **Taurus**, v. 12, n. 1, p. 15–25, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 1, p. 479–486, 2004.
- BASTOS, M. R.; MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.; GUARDIEIRO, M. M.; FERREIRA, J. C. P.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; BIEHL, M. V.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 2, p. 776, 2010. (Abstract).
- BEAL, W. E.; MILVAE, R. A.; HANSEL, W. Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F_{2α} early in the bovine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 2, p. 393-396, 1980.
- BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 432-441, 2001.
- BIEHL, M. V.; ALEXANDRE, P.; SARTORI, R.; GONCALVES, J. R.; LIMA, L. G.; NEPOMUCENO, D. D.; SUSIN, I.; MOURAO, G. B.; VASCONCELOS, J. L. M.; DAY, M. L. Influence of dose of PGF₂-alfa and length of CIDR treatment on reproductive performance of non-lactating Nelore beef cows. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 1, n. 1, p. 322, 2010. (Abstract).
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31–40, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555–1569, 1994.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.307–326, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53–72, 2002.

BRACKETT, B. G.; OH, Y. K.; EVANS, J. F.; DONAWICK, W. J. Fertilization and early development of cow ova. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 189–205, 1980.

BRIDGES, G. A.; HESSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH to PGF_{2 α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

BRUSVEEN, D. J.; SOUZA, A. H.; WILTBANK, M. C. Effects of additional prostaglandin F_{2 α} and estradiol-17 β during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1412-1422, 2009.

BURKE, C. R.; CÁRDENAS, H. M. L.; MUSSARD, M. L.; DAY, M. L. Histological and steroidogenic changes in dominant ovarian follicles during estradiol-induced atresia in heifers. **Reproduction**, v. 129, n. 5, p. 611-620, 2005.

BURKE, C. R.; DAY, M. L. B.; CLARK, A.; BUNT, C. R.; RATHBONE, M. J.; MACMILLAN, K. L. Effect of luteolysis on follicle wave control using estradiol benzoate in cattle. **Endocrinology**, v. 40, n. 1, p. 134, 1997. (Abstract)

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; RUTLEDGE, M. D.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109–117, 2008.

CUERVO-ARANGO, J.; GARCÍA-ROSELLÓ, G.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; VALLDECABRES-TORRES, X.; MARTÍNEZ-ROS, P.; GONZÁLES-BULNES, A. The effect of a single high dose of PGF_{2 α} administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1736-1743, 2011.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R. L.; SAACKE, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2413–2418, 2001.

DALTON, J. C.; SAACKE, R. G. Parâmetros da qualidade do sêmen para programas de sincronização. In: Anais do XI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, 2007, Uberlândia, MG, Brasil.

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 of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 1874–1882, 1998.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animal implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF_{2α} and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1521–1532, 2001.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

GEARY, T. W.; DOWNING, E. R.; BRUEMMER, J. E.; WHITTIER, J. C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. **Professional Animal Scientist**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2000.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852–858, 2008.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 124, n. 4, p. 475-482, 2002.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, n.6 p.1187–1194, 1996.

GONG, J. G.; CAMPBELL, T. A.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicular development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 68-74, 1996.

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 of Dairy Science**, v.86, n.10, p.3184–3194, 2003.

HAWK, H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 7, p. 1487–1503, 1987.

HENRICKS, D. M.; LONG, J. T.; HILL, J. R.; DICKEY, J. F. The effect of prostaglandin F₂ alpha during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 1, p. 113–120, 1974.

KASIMANICKAM, R.; DAY, M. L.; RUDOLPH, J. S.; HALL, J. B.; WHITTIER, W. D. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 762–767, 2009.

MAATJE, K.; LOEFFLER, S. H.; ENGEL, B. Optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1098–1105, 1997.

MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 883–889, 1991.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, 2009.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651–74, 2003.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** 2003. 98 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on

pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1646-1659, 2001.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1, p. 33-42, 2002.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effect of the timing of controlled internal drug-releasing device insertion on the gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone surge and ovulatory response. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 12, p. 3983-3990, 2009.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; DO VALLE E. R.; ENCARNÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

ROELOFS, J. B.; GRAAT, E. A. M.; MULLAART, E.; SOEDE, N. M.; VOSKAMP-HARKEMA, V.; KEMP, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2173-2181, 2006.

ROELOFS, J. B.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Various behavioral signs of estrus and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1366-1377, 2005.

ROWSON, L. E.; TERVIT, R.; BRAND, A. The use of prostaglandins for synchronization of oestrus in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, p. s.3, p. 145, 1972. (Abstract).

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009.

SÁ FILHO, O. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Inseminação artificial em tempo fixo. In: PIRES, A.V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 529-545.

SILVA A. T. N.; **Efeito de diferentes estratégias de manejo reprodutivo em vacas de corte mestiças paridas**. 2007. 51 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O. MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, 2005.

SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, 2011.

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 of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SENGER, P. L.; BECKER, W. C.; DAVIDGE, S. T.; HILLERS, J. K.; REEVES, J. J. Influence of corneal insemination on conception in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 11, p. 3010-3016, 1988.

SIQUEIRA, L. C. **Esteróides no controle da regressão do folículo de diferentes diâmetros para uso em sistemas de inseminação artificial em tempo fixo de vacas de corte no pós-parto**. 2007. 77 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

THATCHER, W. W.; DROST, M.; SAVIO, J. D.; MACMILLAM, K. L.; ENTWISTLE, K. W.; SCHMITT, E. J.; De La SOTA, R. L.; MORRIS, G. R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1, p. 27-49, 1993.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Concepts for the regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 149-164, 1989.

THIBAUT, C. Sperm transport and storage in vertebrates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, n. 1, p. 39–53, 1973.

VALLDECABRES-TORRES, X.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; CUERVO-ARANGO, J. Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4389-4395, 2012.

VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO O. G.; PEREZ, G. C.; SILVA, A. T. N. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus × Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 302–311, 2009.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J.; PURSLEY, J. R. WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

VASCONCELOS, J. L. M.; VILELA, E. R.; SÁ FILHO, O. G. Temporary weaning at two different times of the GnRH-PGF_{2α}-EB synchronization of ovulation protocol in post-partum Nelore cows. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 61, n. 1, p. 95–103, 2009.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate - a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 36–42, 1990.

WHITTIERA, W. D.; KASIMANICKAMB, R. K.; CURRINA, J. F.; SCHRAMMA, H. H.; VLCEK, M. Effect of timing of second prostaglandin F_{2α} administration in a 5-day, progesterone-based CO-Synch protocol on AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1002–1009, 2010.

WILMUT, I.; HUNTER, R. H. F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 24, n. 4, p. 461–468, 1984.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21–52, 2002.

Capítulo II

Efeito de doses de prostaglandina $F_{2\alpha}$ em vacas Nelore nos dias 5 e 7 do ciclo estral

3 EFEITO DE DOSES DE PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ EM VACAS NELORE NOS DIAS 5 E 7 DO CICLO ESTRAL

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de uma única dose de Prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$, 25 mg de Dinoprost trometamina), com o objetivo de induzir a luteólise em vacas, ocorre maior sucesso após o 7º dia do ciclo estral (WENZINGER; BLEUL, 2012). O principal problema da utilização de GnRH no início do protocolo para induzir a ovulação é que, ao final do mesmo, o ovário pode apresentar um corpo lúteo (CL) com apenas 5,5 ou 3,5 dias se utilizar o protocolo 7d ou 5d Co-Synch + P_4 , respectivamente. A atuação da $PGF_{2\alpha}$ em CL's jovens é controversa, pois os modelos utilizados para elucidação da luteólise foram desenvolvidos na década de 80 e com a utilização de animais taurinos (CUERVO-ARANGO et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012; WENZINGER; BLEUL, 2012).

Atualmente um dos protocolos largamente difundidos nos EUA (5d Co-Synch + P_4) utiliza apenas 5 dias de permanência do dispositivo de progesterona, porém este protocolo possui o agravante de reduzir ainda mais a idade do CL ao final do protocolo (BRIDGES et al., 2008). Uma das abordagens utilizadas pelos pesquisadores americanos foi o aumento da dosagem de $PGF_{2\alpha}$. Tendo em vista este cenário, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da dose de $PGF_{2\alpha}$ em promover a luteólise e a taxa de detecção de estro, nos dias 5 e 7 do ciclo estral em vacas da raça Nelore.

Levando em consideração os dados de luteólise de nossa equipe e extrapolando-as para animais zebuínos, formamos as seguintes hipóteses: Quanto maior a dose de $PGF_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral, maior será a taxa de luteólise. A dose dupla de $PGF_{2\alpha}$ aplicada no dia 7 do ciclo estral não aumentará a taxa de regressão luteal quando comparado com a dose recomendada no dia 7 do ciclo estral. Assim, nossa hipótese final é que ocorre interação entre a dosagem de $PGF_{2\alpha}$ (12,5 mg; 25 mg; 50 mg de $PGF_{2\alpha}$) e o dia do ciclo estral (5 e 7).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação Experimental Agrozootécnica *Hildegard Georgina Von Pritzelwiltz* (latitude 23°34'25" sul e longitude 50°58'17" oeste), no Município de Londrina – Paraná, pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, ligada a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP.

Foram utilizadas neste estudo 339 vacas não lactantes da raça Nelore, com útero e ovários aparentemente normais avaliados por ultrassonografia. As vacas foram submetidas à sincronização do estro com a aplicação de uma dose de PGF_{2α} (25 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse® Pfizer Animal Health, New York, NY, USA) em dias aleatórios do ciclo estral. Após a aplicação da PGF_{2α}, foi realizada a detecção do estro de forma visual com auxílio de rufiões munidos de buçais marcadores, sendo o dia do estro considerado dia 0 (zero) do ciclo estral.

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a apresentação do estro, recebendo a dose de PGF_{2α} nos dias 5 e 7 do ciclo estral (5d e 7d). Cada grupo foi subdividido em três, recebendo os seguintes tratamentos PGF_{2α} (12,5 mg; 25 mg; 50 mg), formado um fatorial 2 x 3 (dias do ciclo estral vs doses de PGF_{2α}). O que deu origem aos seguintes tratamentos: 5d12,5PGF_{2α} (n = 57), 5d25PGF_{2α} (n = 58), 5d50PGF_{2α} (n = 58), 7d12,5PGF_{2α} (n = 56), 7d25PGF_{2α} (n = 55) e 7d50PGF_{2α} (n = 55) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema dos tratamentos utilizados no experimento.

Esquema fatorial dos tratamentos - Doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5 mg; 25 mg; 50 mg) nos dias 5 e 7 do ciclo estral (5d e 7d). Tratamentos: 5d12,5 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 57), 5d25 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 58), 5d50 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 58), 7d12,5 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 56), 7d25 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 55) e 7d50 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n = 55).

A confirmação da ovulação ocorreu através de exame ultrassonográfico no dia da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (0 h). Os animais também passaram por ultrassonografia 96 h após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ para a avaliação do tamanho do CL. A detecção do estro foi realizada com rufiões com buçais marcadores por até 96 h após a aplicação de uma das doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A colheita de sangue foi realizada por venopunção da coccígea com o auxílio de tubos vacutainer de 10 mL, nas horas 0, 24 e 48 após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os tubos foram centrifugados durante 15 min a 3500xg. As alíquotas foram estocadas em tubos eppendorf a -20 °C para posterior análise.

A determinação da concentração de progesterona foi realizada por quimiluminescência com a utilização de kit's comerciais para IMMULITE® 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), a qual obteve um coeficiente de variação de 2,7 % para intra-ensaio e 3,6 % para o intra-teste. Todas as análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal – LNRA/ESALQ/USP.

A presença do CL foi confirmada quando as vacas apresentaram concentração de progesterona ≥ 1 ng/ml na 0 h e o CL foi considerado regredido quando a concentração de progesterona foi < 1 ng/mL (taxa de

regressão luteal 1) e $< 0,5$ ng/mL (taxa de regressão luteal 0,5), 48 h após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

O delineamento utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×3 , (dia do ciclo estral $\times$ dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$). Para a avaliação das variáveis com distribuição binomial (taxa de regressão luteal 1, taxa de regressão luteal 0,5, taxa de detecção de estro), utilizou-se o procedimento estatístico GLIMMIX. Para a análise das variáveis diâmetro dos CL's 0 e 96 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi utilizado o procedimento MIXED. A análise da concentração de P_4 foi analisada separadamente nos dias 5 e 7 do ciclo estral utilizando medidas repetidas no tempo, feitas no procedimento estatístico MIXED, no qual os fatores foram as doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a medida repetida foi a concentração de P_4 nas horas 0, 24 e 48 após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Antes porém da análise pelo procedimento MIXED, foi verificado a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias; os dados que não atenderam essas premissas passaram por transformação logarítmica $[\log_{10}(x + 1)]$ antes de serem analisados. Ambos os procedimentos, GLIMMIX e MIXED são do pacote estatístico SAS 9.3. Foi considerado como diferença significativa quando o valor de P foi menor que 5 %.

3.3 RESULTADOS

A taxa de regressão luteal 1 (< 1 ng/mL em 48 h) e 0,5 ($< 0,5$ ng/mL em 48 h) no tratamento 5d50 $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi cerca de 60 e 30 %, respectivamente (Figura 2). Esses resultados são bastante semelhantes aos animais tratados com 12,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral (7d12,5 $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Figura 2). A taxa de regressão luteal 1 e 0,5 foi 13 e 10,9 %, respectivamente, maior na dose de 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral quando comparado com a dose normal recomendada pelo fabricante (25 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Figura 2).

Nos tratamentos com $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral, principalmente com as doses de 12,5 e 25 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$, houve retorno da função luteal, ou seja, ocorreu luteólise parcial (Figura 2). Já no dia 7 do ciclo estral, a taxa de retorno da função luteal quase não ocorreu, mesmo na dose de 12,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Figura 2 – Taxa de regressão luteal 1 e 0,5 (Reg1 e Reg05, respectivamente), de regressão parcial (Ret – considerando apenas as vacas que a concentração de P_4 chegou abaixo de 1 ng/mL em 24 h e em 48 h voltou a ficar acima de 1 ng/mL) e de estro em cada tratamento.

Tratamento 1 - 5d12,5PGF_{2α} (n = 57); Tratamento 2 - 5d25PGF_{2α} (n = 58); Tratamento 3 - 5d50PGF_{2α} (n = 58); Tratamento 4 - 7d12,5PGF_{2α} (n = 56); Tratamento 5 - 7d25PGF_{2α} (n = 55); Tratamento 6 - 7d50PGF_{2α} (n = 55).

Não houve interação entre dia do ciclo estral (5 e 7) e doses de PGF_{2α} (12,5 mg; 25 mg; 50 mg de Dinoprost trometamina) para nenhuma variável. Assim, nossa hipótese de que haveria interação entre os dois fatores não se confirmou, sendo os fatores (dia do ciclo estral e dose de PGF_{2α}) analisados separadamente em todas as variáveis.

As doses de PGF_{2α} (12,5, 25 e 50 mg) não alteraram o tempo médio de aparecimento do estro ($P = 0,8490$). No entanto, as vacas que receberam a PGF_{2α} no dia 5 do ciclo estral apresentaram o estro mais tardiamente do que as vacas que receberam a PGF_{2α} no dia 7 do ciclo estral ($76,0 \pm 3,12$ vs $66,0 \pm 2,29$ h – $P = 0,0001$, respectivamente). A apresentação do estro variou de 24 até 120 h após a administração de PGF_{2α} (Figura 3), e houve uma concentração na apresentação de estro em 72 h após a administração da PGF_{2α}.

Figura 3 – Distribuição de estro das vacas que receberam uma das 3 doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 ou 50 mg) nos dias 5 ou 7 do ciclo estral

Na hora 0 (hora da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$), o diâmetro do CL dos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral foi maior quando comparado com o CL dos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral ($15,3 \pm 0,20$ vs $12,5 \pm 0,18$ mm – $P = 0,0001$, respectivamente) (Figura 4). O tamanho do CL na hora 0 não diferiu entre as doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($P = 0,2877$) (Figura 4).

Figura 4 – Diâmetro do CL na hora 0 (hora da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

O diâmetro do CL 96 h após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi maior nos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral quando comparado com os animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral (12,2 vs 9,3 mm – $P = 0,0001$, respectivamente) (Figura 5). Também houve diferença no tamanho do CL (96 h) de acordo com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada (12,5, 25 e 50 mg). As vacas que receberam a dose de 12,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentaram diâmetro do CL 96 h maior do que as vacas que receberam a dose de 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($11,6 \pm 0,36$ vs $10,1 \pm 0,37$ mm, $P = 0,0001$) (Figura 5).

Figura 5 – Diâmetro do CL na hora 0 (hora da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância a 5%.

Ao levar em consideração que a regressão luteal ocorre quando a concentração de P_4 fica abaixo de 1 ng/mL 48 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$, observamos que quando a $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi administrada no dia 7 do ciclo estral houve 76,9 % de regressão luteal, taxa bem maior que nos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ na dia 5 do ciclo estral (37,0 % - $P = 0,0001$) (Figura 6). A medida que se aumentou a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) administrada nos animais, aumentou a taxa de regressão luteal (39,0, 56,9 e 76,5 % - $P = 0,0001$) (Figura 6).

Figura 6 – Taxa de regressão luteal 1 (concentração de P_4 abaixo de 1 ng/mL 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (dia 5 e 7 do ciclo estral) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Ao levar em consideração regressão luteal quando a concentração de P_4 atingiu concentrações de P_4 menores que 0,5 ng/mL em 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$, observamos que a $PGF_{2\alpha}$ administrada no dia 7 do ciclo estral causou uma maior taxa de regressão luteal quando comparado com os animais que receberam a $PGF_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral (57,5 vs 21,7 %, $P = 0,0001$) (Figura 7). A taxa de regressão luteal foi maior nos animais que receberam 50 mg de $PGF_{2\alpha}$ quando comparado com os animais que receberam 12,5 mg de $PGF_{2\alpha}$ (49,3 vs 29,7 % – $P = 0,0182$) (Figura 7).

Figura 7 – Taxa de regressão luteal 0,5 (concentração de P_4 abaixo de 0,5 ng/mL 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$) de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

A taxa de detecção de estro acompanhou o que aconteceu com o diâmetro do CL 96 h após a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e com as taxas de regressão luteal (1 e 0,5 mg/mL). Os animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral apresentaram maior taxa de detecção de estro, quando comparado com os animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral (46,8 vs 22,7 % - $P = 0,0001$) (Figura 8). A medida que se aumentou a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg), a taxa de detecção de estro foi aumentada (16,9, 35,8 e 53,4 % - $P = 0,0001$) (Figura 8).

Figura 8 - Taxa de detecção de estro de acordo com o dia do ciclo estral (5 e 7) e com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg de Dinoprost trometamina) administrada

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Nos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral a concentração de P_4 não diferiu na hora 0 entre as 3 doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os animais que receberam 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentaram menor concentração de P_4 nas horas 24 e 48 após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, quando comparado com os animais que receberam 12,5 mg nas horas 24 ($1,12 \pm 0,08$ vs $0,69 \pm 0,07$ - $P = 0,0004$) e 48 ($1,65 \pm 0,11$ vs $1,09 \pm 0,12$ - $P = 0,0009$) (Figura 9).

A concentração de P_4 seguiu o mesmo padrão nas doses de 25 e 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A concentração caiu ao menor nível em 24 h após o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$, atingindo inclusive concentrações de P_4 menor que 1 ng/mL ($0,85 \pm 0,07$ e $0,69 \pm 0,07$ ng/mL, respectivamente) o que indica luteólise. A concentração de P_4 atingiu concentração média maior que 1 ng/mL ($1,34 \pm 0,11$ e $1,09 \pm 0,12$, respectivamente) em 48 h após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$,

mostrando que o CL retoma a função luteal. No entanto, com uma luteólise parcial, uma vez que a concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em 48 h foi menor que em 0 h (Figura 9). A concentração de P_4 nos animais que receberam a dose de 12,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ também atingiu a menor concentração 24 h após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, mas a concentração de P_4 nesta hora não foi inferior a 1 ng/mL. Em 48 h após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a concentração de P_4 voltou a ser igual a concentração em 0 h ($1,69 \pm 0,11$ vs $1,65 \pm 0,11$ ng/mL, respectivamente) (Figura 9), caracterizando o reestabelecimento da função luteal.

Figura 9 - Concentração de Progesterona (P_4) 0, 24 e 48 h após a administração de doses de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) nos dias 5 e 7 do ciclo estral

Médias seguidas por diferente letras maiúsculas apresentam diferença significativa nas horas ($P < 0,05$), letras minúsculas indicam diferença significativa entre as horas ($P < 0,05$).

No dia 7 do ciclo estral não houve diferença na concentração de P_4 na hora 0 de acordo com a dose de $PGF_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) administrada. Na hora 24 também não houve diferença na concentração de P_4 dos animais que receberam as doses de $PGF_{2\alpha}$, no entanto houve uma tendência da dose de 50

mg proporcionar uma concentração de P_4 menor quando comparado com a dose de 12,5 mg de $PGF_{2\alpha}$ ($0,71 \pm 0,11$ vs $1,04 \pm 0,10$ ng/mL – $P = 0,0921$) (Figura 9). Na hora 48, a dose 50 mg de $PGF_{2\alpha}$ proporcionou menor concentração de P_4 quando comparado com 12,5 mg de $PGF_{2\alpha}$ ($0,51 \pm 0,07$ vs $1,14 \pm 0,15$ ng/mL – $P = 0,0006$) (Figura 9). Houve uma tendência da dose de 25 mg de $PGF_{2\alpha}$ proporcionar menor concentração de P_4 quando comparado com a dose 12,5 mg de $PGF_{2\alpha}$ ($0,70 \pm 0,11$ vs $1,14 \pm 0,15$ ng/mL – $P = 0,0760$) (Figura 9).

A dose de 12,5 e 25 mg de $PGF_{2\alpha}$ teve o mesmo comportamento nas horas 0, 24 e 48 (Figura 9). Houve uma grande queda na concentração de P_4 da hora 0 para a hora 24 e não houve diferença na concentração de P_4 da hora 24 para a hora 48. No entanto, na dose de 25 mg de $PGF_{2\alpha}$ a concentração de P_4 ficou abaixo de 1 ng/mL, o que indica luteólise. Na dose de 12,5 mg de $PGF_{2\alpha}$ a concentração de P_4 nas horas 24 e 48 ficou acima de 1 ng/mL, mostrando uma luteólise incompleta, mesmo no dia 7 do ciclo estral. A dose de 50 mg foi capaz de manter queda da concentração de P_4 , houve uma grande queda da hora 0 para a 24 ($3,08 \pm 0,11$ vs $0,71 \pm 0,08$ - $P = 0,0001$) e da 24 para 48 ainda continuou caindo ($0,71 \pm 0,08$ vs $0,51 \pm 0,07$ – $P = 0,0032$) (Figura 9).

3.4 DISCUSSÃO

A apresentação de estro variou entre 24 a 120 h após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$ (Figura 3). As vacas que receberam a $PGF_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral apresentaram estro mais cedo, quando comparado com as vacas que receberam a $PGF_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral. A variação no tempo entre o início do pro-estro (aplicação de $PGF_{2\alpha}$) e a manifestação do estro depende, principalmente, do estágio da onda de desenvolvimento folicular que o animal estava no momento da administração da $PGF_{2\alpha}$ (SMITH et al., 1998). Pressupõe-se que as vacas que receberam a $PGF_{2\alpha}$ no dia 7 apresentavam o folículo dominante mais velho do que as vacas que receberam a $PGF_{2\alpha}$ no dia

5 do ciclo estral, pois quando ocorre ovulação começa uma nova onda de desenvolvimento folicular (MOREIRA, et al., 2000; SARTORI et al., 2001).

Na hora 0 (hora de administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$) os animais que estavam no dia 5 do ciclo estral apresentavam diâmetro do CL menor que os animais que estavam no dia 7 do ciclo estral, isto era esperado pois o CL em *Bos taurus indicus* cresce até por volta do dia 9 do ciclo estral (VIANA et al., 1999). O diâmetro do CL 96 h após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi maior nos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral, indicando que no dia 5 do ciclo estral houve menor taxa de luteólise. Segundo Cuervo-Arango et al. (2011) quando há luteólise completa, o CL regride completamente e se torna quase imperceptível em 4 dias. No entanto, quando há luteólise parcial o CL regride significativamente nas 12 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e permanece menor até o final do ciclo estral (CUERVO-ARANGO et al., 2011; WENZINGER; BLEUL, 2012). Assim, quanto menor o diâmetro do CL nos dias posteriores à aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ maior luteólise, sendo esta completa ou parcial. Ao analisar o diâmetro do CL de acordo com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) administrada, observa-se que a dose de 12,5 mg resultou em maior diâmetro do CL em 96 h após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ quando comparado com a dose de 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$, indicando que a dose de 12,5 mg causou menor taxa de luteólise.

Considerando como regressão luteal concentrações de P_4 menores que 1 ou 0,5 ng/mL 48 h após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, a taxa de regressão luteal foi maior no dia 7 do ciclo estral. Isso ocorre porque nesta idade o CL é mais responsivo a $\text{PGF}_{2\alpha}$ do que no dia 5 do ciclo estral (CUERVO-ARANGO, et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012; WENZINGER; BLEUL, 2012). Segundo Wenzinger e Bleul (2012), a transição do CL de refratário para responsivo à $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorre 5 dias após a ovulação. No entanto, nossos dados apontam que a aplicação da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (25 mg) recomendada pelo fabricante foi eficaz em promover a luteólise em 56,9 % (levando em consideração 1 ng/mL de P_4) dos CL's, sendo que a dose dupla (50 mg) foi capaz de aumentar a luteólise em torno de 20 pontos percentuais (76,5 %) de luteólise, comparada com a dose recomendada. O que diverge de nossa hipótese que no 7º dia do ciclo estral a dose dupla não aumentaria a taxa de luteólise comparado com a dose normal (25 mg). Outro ponto importante é que

a administração da meia dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5 mg) obteve uma resposta insuficiente, um alerta para o uso de meia dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em protocolos de IATF, principalmente nos lotes de vacas cíclicas.

Ao comparar a regressão luteal tendo como parâmetro 1 ou 0,5 ng/mL de P_4 48 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, observamos que as taxas de regressão luteal caem bastante nos dois fatores (dia do ciclo estral e dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$). Por exemplo, a dose dupla de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (50 mg) e o dia 7 do ciclo estral caem cerca de 20 a 25 pontos percentuais, respectivamente. Isso tem importância em protocolos de IATF, pois vacas que têm concentrações de P_4 maiores que 0,5 ng/mL podem ter a fertilidade prejudicada (BELLO et al., 2006; STEVENSON et al., 2010).

Brusveen et al. (2009) constataram que vacas leiteiras submetidas ao protocolo *Ovsynch* e que receberam 2 doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentaram maior taxa de prenhez, isso porque os animais que receberam 2 doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentaram 95,6 % de regressão luteal completa enquanto que as vacas que receberam apenas 1 dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tiveram 84,6 % de regressão completa dos CL's. Assim concentrações de P_4 maiores que 0,5 ng/mL podem comprometer a fertilidade das vacas, pois o aumento da concentração de P_4 no momento da IA pode prejudicar o ambiente do trato reprodutivo para transporte do óvulo e do espermatozoides (BRUSVEEN et al., 2009). O uso da dose dupla no dia 7 do ciclo estral (Figura 9) foi o único tratamento que chegou perto da concentração ideal de P_4 próximo a IA (0,51 ng/mL), este tratamento foi o único que a concentração de P_4 cai de 24 para 48 h, mostrando que neste tratamento houve uma luteólise mais rápida e mais completa que os outros tratamentos.

A concentração média de P_4 no dia 5 do ciclo estral tem como padrão a luteólise parcial, ou seja, ocorre a queda da concentração de P_4 por 6 a 24 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, e posterior retorno da concentração de P_4 à concentrações iguais ou menores que no momento de administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MEIRA et al., 2006; GINTHER et al., 2009; ATLI et al., 2012). Esses estudos trabalharam com sub-doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o início da fase luteínica, e em nosso estudo, trabalhamos até com doses $\text{PGF}_{2\alpha}$ superiores às recomendadas pelo fabricante (50 mg) em relação à esses estudos e tivemos uma resposta semelhante. Nossos dados também mostram que no dia 5 do ciclo estral a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exerceu influência (Figura 9) na resposta à

luteólise parcial. Nas três doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (12,5, 25 e 50 mg) ocorreu uma queda da concentração de P_4 24 h após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e posterior retomada da função luteal em 48 h. Com as doses de 25 e 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a concentração de P_4 chegou a concentrações menores que 1 ng/mL (indicando luteólise), no entanto em 48 h o CL retomou, parcialmente, a função luteal. Nessas duas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a concentração de P_4 48 h não foram iguais à hora 0, mostrando que essas doses causaram danos a função luteal. Na dose de 12,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na hora 24 a concentração de P_4 caiu, mas não abaixo de 1 ng/mL. Porém nas 48 h a concentração de P_4 voltou a ser igual a concentração na hora 0, mostrando assim, que a luteólise parcial no dia 5 do ciclo estral é dependente da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada.

Na luteólise parcial, acredita-se, que há inicialmente diminuição de StAR e NRA5A1 (responsáveis pelo transporte do colesterol que será transformado em P_4 pela mitocôndria), no entanto é mantido a capacidade de expressão de genes-chave para a função esteroidogênica (LHCGR, CYP11A1 e P_450scc) (ATLI et al., 2012). Posteriormente, há recuperação da expressão de StAR, e assim é retomada a produção de P_4 .

No dia 7 do ciclo estral a concentração média de P_4 caiu drasticamente em todas as 3 doses (12,5, 25 e 50 mg) e não ocorreu o padrão de luteólise parcial (retomada da produção de P_4 em 48 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$). No entanto, também há efeito da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na regressão do CL, pois a dose de 50 mg causou a menor concentração de P_4 em 48 h. Valdecabres-Torres et al. (2012) realizaram um experimento semelhante, no qual testaram a dose normal (150 μg) e dose dupla (300 μg) de d-cloroprostenol em 4 momentos distintos (96, 108, 124 e 130 h após a ovulação). Os autores testaram as doses entre o 5º e 6,5º dia do ciclo estral, a partir do início do estro. Os autores também observaram que à medida que se aumenta a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$, aumenta-se a porcentagem de regressão do luteal. No dia 6,5, os autores encontraram 60 % vs 80 % de regressão para dose simples e dupla, respectivamente. Dados semelhantes aos nossos que observamos 56,9 e 76,5 % de taxa de regressão luteal 1 (< 1 ng/mL) para as doses de 25 e 50 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A resistência natural do CL à luteólise durante o início do diestro tem sido extensamente estudada em ruminantes (VALLDECABRES-TORRES et

al., 2012) e ainda não está completamente entendida. Uma possível explicação é a redução da disponibilidade da endotelina-1 (LEVY et al., 2000) e aumento da disponibilidade de prostaglandina-desidrogenase (SILVA et al., 2000) no CL jovem, quando comparado com o CL maduro. A endotelina-1 é um vasoconstritor proteináceo e também modula as células esteroidogênicas, essa proteína é produzida pelas células endoteliais, em resposta a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e assim altera a produção de progesterona em bovinos (LEVY et al., 2000). Enquanto a prostaglandina-desidrogenase metaboliza $\text{PGF}_{2\alpha}$ em sua forma inativa (SILVA et al., 2000). Assim, é possível que altas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ poderiam compensar estes efeitos antiluteolíticos, resultante do aumento da prostaglandina-desidrogenase e redução das concentrações de endotelina-1 em CL jovens.

Meira et al. (2006) trabalharam com vacas nelore e observaram que as vacas que expressaram estro apresentavam menor concentração de P_4 24 e 48 h após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A apresentação de estro foi reflexo da taxa de regressão luteal, por isso o grupo dos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 7 do ciclo estral apresentou maior taxa de estro quando comparado com o grupo dos animais que receberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no dia 5 do ciclo estral. Quanto a dosagem de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorre a mesmo comportamento, à medida que a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é aumentada, a taxa de apresentação de estro também aumenta.

3.5 CONCLUSÃO

- Nossa hipótese não foi confirmada, pois não houve interação entre o dia do ciclo estral e a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ administrada.
- A capacidade da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em induzir a regressão luteal aumenta do 5º para o 7º dia do ciclo estral e de acordo com a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$.
- O aumento da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a taxa de regressão luteal.
- A taxa de detecção de estro foi dependente da regressão luteal.
- A concentração de P_4 no dia 5 do ciclo estral segue o padrão de luteólise parcial e quanto maior a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$, maior o dano à função luteal.

- No dia 7 do ciclo estral não ocorreu o padrão de retomada da função luteal.
- A dose de 12,5 mg de PGF_{2α} não foi eficiente em causar luteólise total.
- A dose de 50 mg de PGF_{2α} foi capaz de promover a menor e mais rápida queda da concentração de P₄.

REFERÊNCIAS

ATLI, M.; BENDER, R. W.; MEHTA, V.; BASTOS, M.; LUO, W.; VEZINA, C. M.; WILTBANK, M. C. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intra-uterine infusions of low doses of prostaglandin F_{2α}. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 4, p. 1-13, 2012.

BELLO, N. M.; STEIBEL, J. P.; PURSLEY, J. R. Optimizing Ovulation to 1st GnRH Improved Outcomes to Each Hormonal Injection of Ovsynch in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3413-3424, 2006.

BRUSVEEN, D. J.; SOUZA, A. H.; WILTBANK M. C. Effects of additional prostaglandin F_{2α} and estradiol-17beta during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1412-1422, 2009.

BRUSVEEN, D. J.; SOUZA, A. H.; WILTBANK, M. C. Effects of additional prostaglandin F_{2α} and estradiol-17beta during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1412-1422, 2009.

CUERVO-ARANGO, J.; GARCÍA-ROSELLÓ, G.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; VALLDECABRES-TORRES, X.; MARTÍNEZ-ROS, P.; GONZÁLES-BULNES, A. The effect of a single high dose of PGF_{2α} administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1736-1743, 2011.

GINTHER, O. J.; ARAUJO, R. R.; PALHÃO, M. P.; RODRIGUES, B. L.; BEG, M. A. Necessity of sequential pulses of prostaglandina F_{2α} for complete physiological luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**. v. 80, n. 4, p. 641-648, 2009.

LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, Z.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO A. Administration of prostaglandin F_{2α} during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its type A receptor: A possible cause for corpus luteum refractoriness. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 377-382, 2000.

MEIRA, C.; PESSOA, V. M.; FERREIRA, J. C. P.; ARAUJO, G. H. M.; GIOSO, M. M.; BICUDO, S. D.; OBA, E.; ORLANDI, C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F_{2α} analogue to induce luteolysis in Nelore cows. **Journal of Veterinary Science**. v. 7, n. 4, p. 387-390, 2006.

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.

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 of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

SILVA, P. J.; JUENGEL J. L.; ROLLYSON, M. K.; NISWENDER G. D. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: Catabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) coincides with resistance of the corpus luteum to $PGF_{2\alpha}$. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1229-1236, 2000.

SMITH, S. T.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Use of ultrasonography to help to predict observed oestrus in dairy cows after the administration of prostaglandin $F_{2\alpha}$. **Veterinary Record**, v. 142, n. 11 p. 271–274, 1998.

STEVENSON, J. S.; PHATAK, A. P. Rates of luteolysis and pregnancy in dairy cows after treatment with cloprostenol or dinoprost. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1127-1138, 2010.

VALLDECABRES-TORRES, X.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; CUERVO-ARANGO, J. Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4389-4395, 2012.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F. CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999.

WENZINGER, B.; BLEUL, U. Effect of a prostaglandin $F_{2\alpha}$ analogue on the cyclic corpus luteum during its refractory period in cows. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 8, p. 220-225, 2012.

Capítulo III

Efeito do protocolo de 5 dias de P_4 + ECP + eCG sobre a taxa de ovulação dupla em vacas Nelore.

4 EFEITO DO PROTOCOLO DE 5 DIAS DE P₄ + ECP + ECG SOBRE A TAXA DE OVULAÇÃO DUPLA EM VACAS NELORE.

4.1 INTRODUÇÃO

O mecanismo de desvio durante a onda de desenvolvimento folicular ocorre em espécies monovulatórias (presença de um folículo dominante) o que inclui os bovinos. Quando dois ou mais folículos assumem a dominância durante uma onda de desenvolvimento folicular, resulta em um fenômeno chamado de codominância (ACOSTA et al., 2005). O uso de gonadotrofinas antes que haja o desvio do folículo dominante pode causar codominância e posterior ovulação dupla.

Em um protocolo de IATF que utiliza estrógeno + progesterona para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular, a nova onda de desenvolvimento folicular emerge entre 3 a 4 dias após a aplicação do estrógeno + progesterona. Bogacz et al. (1999) indicaram que a eficácia do benzoato de estradiol (BE) em induzir a atresia é dose-dependente até que se atinja um limiar de dosagem (1 mg i.m./500 kg peso corporal [PC]), enquanto doses de BE superiores à necessária para promover atresia do folículo dominante de forma consistente (2 mg i.m. /500 kg PC) resultam em maiores intervalos entre o tratamento e a emergência de uma nova onda folicular.

Nossa hipótese é que a aplicação de 300 UI eCG no dia 5 do protocolo pode causar codominância e assim ovulação dupla. A outra hipótese é que a aplicação de 1 ou 2 mg de BE no início do protocolo pode influenciar a taxa de ovulação dupla. Diante do exposto, nosso objetivo foi verificar se o protocolo de 5 dias de P₄ + estrógenos + eCG causa ovulação dupla. E verificar se a utilização de 1 ou 2 mL de BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular interfere na taxa de ovulação dupla, no diâmetro do folículo dominante no dia 5 e 7 do protocolo de IATF e na taxa de crescimento do folículo ovulatório.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na fazenda São Marcos, localizada no município de Aurora do Pará, Estado do Pará. Durante o experimento, os animais foram mantidos em regime de pasto formado de *Brachiaria brizantha*, com suplementação de sal mineral.

Foram realizados 2 experimentos. Nos experimentos I e II foram utilizadas 25 e 60 multíparas, respectivamente. Em ambos os experimentos as vacas eram de descarte e da raça Nelore. Todas as vacas apresentavam útero e ovários aparentemente normais, quando avaliados por ultrassonografia. Em ambos os experimentos (I e II), as vacas foram divididas em 2 grupos, de acordo com a presença de corpo lúteo no dia da inserção do dispositivo de P₄, sendo as vacas com e sem CL divididas igualmente dentro dos 2 tratamentos. O tratamento A recebeu 1 mL de BE para a sincronização da onda de desenvolvimento folicular, enquanto que o tratamento B recebeu 2 mL de BE para a sincronização da onda de desenvolvimento folicular (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos animais nos tratamentos A e B nos experimentos (I e II), e de acordo com a presença de corpo lúteo (CL - sem e com) no momento da colocação do dispositivo de progesterona

Animais		Tratamento	
		A	B
Exp.I	Com CL	7	5
	Sem CL	6	7
Exp. II	Com CL	25	25
	Sem CL	5	5
Total		42	43

No dia 0 as vacas receberam um implante de P₄ de segundo uso (CIDR, Pfizer, Brasil) e a dose de BE (Estrogin[®], Farmavet, Brasil) segundo o tratamento pertencente (tratamento A – 1 mg de BE, tratamento B – 2 mg de BE). Cinco dias após, o dispositivo foi retirado e aplicou-se 25 mg de Dinoprost trometamina (Lutalyse[®] Pfizer, Brasil), 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.[®], Pfizer, Brasil) e 300 IU de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Folligon[®], Intervet, Brasil), conforme mostra a Figura 10. A IA foi realizada 56 h

após a remoção do CIDR. No entanto, apenas os animais do experimento II foram inseminados, os animais do experimento I não receberam a IA.

Figura 10 - Esquema do protocolo de sincronização utilizado no experimento I e II. Apenas os animais do experimento II passaram por inseminação artificial 55 h após a remoção do dispositivo de P₄

No experimento I, a detecção do estro foi realizada de forma visual, 1h no período da manhã (AM) e 1h no período da tarde (PM) durante 4 dias a partir da remoção do dispositivo de P₄. No experimento 2, o estro dos animais foi avaliado com o dispositivo Estrotest (Rockway Inc., Spring Valley, WI), sendo o dispositivo avaliado duas vezes ao dia (AM e PM), durante 4 dias a partir da remoção do dispositivo de P₄.

A confirmação da ovulação e a quantificação de CL's ocorreram sete dias após IA, por meio da ultrassonografia (US) e coleta de sangue para posterior dosagem de progesterona. O diagnóstico de gestação ocorreu 30 dias após a IA por ultrassonografia. Os animais também passaram por US no dia 5 e 7 do protocolo de IATF, de modo a rastrear e mensurar o folículo dominante, além de calcular a taxa de crescimento em cada tratamento. A taxa de codominância foi calculada através da porcentagem de vacas que apresentavam mais de 1 folículo com diâmetro maior que 8 mm no dia 7 do protocolo, caracterizando isto como codominância. Vacas com apenas 1 folículo maior que 8 mm de diâmetro foram consideradas sem codominância.

A dosagem de progesterona do experimento I e II foi realizada por quimioluminescência, utilizando kit's comerciais para IMMULITE[®] 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), a qual obteve um coeficiente de variação de 2,7 % para intra-ensaio e 3,6 % para o intra-teste. As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal – LNRA/ESALQ/USP.

O delineamento utilizado nos dois experimentos foi o delineamento inteiramente casualizado e os experimento I e II foram considerados com bloco. A taxa de ovulação (1 – vacas que ovularam e 0 – vacas que não ovularam), ovulação dupla [1 – vacas que tiveram ovulação dupla e 0 – vacas que não tiveram ovulação dupla (ovulação simples + não ovularam)], de codominância (1 – vacas com mais de um folículo maior que 8 mm no dia 7 do protocolo e 0 – vacas com apenas um folículo maior que 8 mm no dia 7 do protocolo) e de detecção de estro foi analisada utilizando o procedimento GLIMMIX, pois são variáveis que possuem distribuição binomial. Para análise do diâmetro do folículo no dia 5 e 7 do protocolo, bem como a taxa de crescimento folicular, foi utilizado a análise de variância ($P < 0.05$), por meio do procedimento MIXED. Antes porém, da análise pelo procedimento MIXED, foi verificado a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias; os dados que não atenderam essas premissas passaram por transformação logarítmica [$\log_{10}(x + 1)$] antes de serem analisados. Ambos os procedimentos, GLIMMIX e MIXED são do pacote estatístico SAS 9.3.

4.3 RESULTADOS

Não houve efeito significativo na taxa de ovulação, na taxa de ovulação dupla e na taxa de detecção de estro entre os tratamentos (Figura 11). A porcentagem de ovulação dupla foi de 5,0 % (3/60). Sete animais (11,7 %) não ovularam ao protocolo de 5 dias de P_4 . Desses 7 animais, 2 apresentaram estro, depois do protocolo (Figura 11). A taxa de vacas com codominância foi menor no tratamento A, ou seja, cerca 50 % das vacas tratadas com 2 mL de BE no início do protocolo apresentavam mais de um folículo maior que 8 mm no dia 7 do protocolo (Figura 11 e Tabela 3).

Figura 11 - Porcentagem de ovulação, de ovulação dupla e de estro nos tratamentos A e B (A – 1 mg de BE, B – 2 mg de BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular)

Médias seguidas de letras diferentes, em cada variável, não diferem entre si ao nível de significância de 5 %.

Não houve influência dos tratamentos A e B nas variáveis, diâmetro do folículo no dia 5 e 7 do protocolo e na taxa de crescimento folicular (Tabela 3). O diâmetro médio do folículo dominante no dia 5 e no dia 7 do protocolo de IATF foi 8,5 e 11,2 mm, respectivamente. A taxa de crescimento médio do folículo dominante de 1,4 mm por dia.

Tabela 3 - Diâmetro do folículo dominante (FD) no dia 5 (D5 - dia da remoção do CIDR) e no dia 7 (D7) do protocolo de IATF de acordo com os tratamentos A e B (A – 1 mg de BE, B – 2 mg de BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular), bem como a taxa de crescimento por dia do folículo dominante

	Tratamento		Média	EPM	P-valor
	A	B			
FD D5, mm	8,5	8,5	8,5	0,27	0,9509
FD D7, mm	11,1	11,3	11,2	0,34	0,8029
Taxa Crescimento, mm*	1,3	1,5	1,4	0,23	0,4117
Taxa de Codominância, %**	28,7a	50,6b	40,9	.	0,0460

EPM – Erro padrão da média * Taxa crescimento = (FD D5 – FD D7)/2, crescimento do FD entre os dias 5 e 7 do protocolo de IATF. **Taxa de codominância = animais que apresentavam mais de 1 folículo maior que 8 mm de diâmetro no dia 7 do protocolo. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Através da utilização do adesivo de detecção de estro no experimento II foi possível observar que todos os animais que ovularam foram detectados em estro. Isso permitiu avaliar a prenhez no protocolo de acordo com a distribuição

do estro, conforme mostra a Figura 12. Os animais que apresentaram estro 48 h após a remoção do dispositivo de P₄ e passaram por IA 6 h após a detecção do estro, apresentaram taxa de concepção de 56,5%. O tempo médio de aparecimento do estro não sofreu influência do tratamento ($P = 0,8490$). O tempo médio de aparecimento de estro foi de $59,2 \pm 1,75$ horas (2,4 dias).

Figura 12 - Distribuição do estro (n - número de animais) após a retirada do CIDR e porcentagem de gestação de acordo a manifestação do estro. A seta indica o horário (56 h) que os animais passaram por inseminação artificial

4.4 DISCUSSÃO

A utilização do protocolo de 5 dias de progesterona com o BE para sincronizar a onda de desenvolvimento folicular e o ECP + eCG para induzir a ovulação e crescimento do FD, respectivamente, causou uma taxa média de ovulação dupla de 5,9 %. A ovulação dupla no protocolo de 5 dias com estrógeno pode ser causada pela administração de eCG antes que ocorra a divergência folicular. Quando aplicado o BE + P₄ nos animais, uma nova onda de desenvolvimento folicular começa. O início da nova onda de desenvolvimento folicular varia de 2,2 a 6,5 dias após a aplicação do

estrógeno, conforme revisado por Day et al. (2010). Nossa hipótese é que o eCG poderia ser aplicado quando a onda de desenvolvimento folicular tivesse em estágio inicial de desenvolvimento, sem que houvesse ainda a divergência folicular, causando codominância e dupla ovulação. Essa hipótese foi, em parte, confirmada, uma vez que houve 5,9 % de ovulação dupla. No entanto, a hipótese de que a dose de BE influencia na taxa de ovulação dupla não foi confirmada, apesar de tratamento A levar a uma menor taxa de codominância.

Nós consideramos a taxa de ovulação dupla no protocolo estudado dentro do esperado quando se usa protocolos de IATF. Sales et al. (2012) observaram que a utilização de BE ou ECP combinado com eCG (300 UI) em vacas Nelore no dia 8 do protocolo de IATF causou, respectivamente, 4,8 e 4,2 % de ovulação dupla (SALES et al., 2012). Tibulo et al. (2002) utilizaram 300 UI de eCG em vacas *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus* no dia 5 do protocolo, encontraram uma taxa de ovulação dupla de 2 % (31/156), taxa de ovulação semelhante a encontrada em nosso trabalho.

Trabalhos com transferência de embriões mostraram que a utilização de eCG (1000 UI) em novilhas holandesas no 4º dia após a sincronização da onda de desenvolvimento folicular com 5 mg de estrógeno resultou em 2 a 5 CL's por animal (BÓ et al., 2002). Baruselli et al. (2001) em estudo semelhante com novilhas *Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus* tratadas com 800 UI de eCG no dia 5 do protocolo (dia 0 – dia da inserção do dispositivo de P₄ e aplicação de 2 mg de BE) resultou em 2,6 CL's por animal. Estes últimos estudos mostram que o uso do eCG por volta do dia 5 do protocolo de sincronização pode levar a ovulação dupla, no entanto para isso é importante a dose de eCG utilizada. Nos estudos que obtiveram altas taxas de ovulação dupla, a dose de eCG são cerca de 3 vezes maiores do que a utilizada em nosso protocolo. Mostrando que a dose do eCG é fundamental para que ocorra alta taxa de codominância e posterior ovulação dupla.

A taxa de codominância foi influenciada pelo tratamento, vacas que receberam 2 mL de BE no início do protocolo apresentavam maior incidência de mais de um folículo dominante (maior que 8 mm de diâmetro) no dia 7 do protocolo. Isso mostra que a maior dose de BE no início do protocolo pode ter influenciado o início da onda de desenvolvimento folicular. Burke et al. (2003) testaram essa hipótese administrando 0, 1, 2 ou 4 mg de BE i.m. /500 kg de

peso corporal, o momento do pico do FSH ocorreu às $29,3 \pm 4,0$; $53,3 \pm 4,5$; $81,1 \pm 15,5$ e $91,4 \pm 8,2$ h, respectivamente. A emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular ocorreu nos dias $1,5 \pm 0,2$, $3,3 \pm 0,3$, $4,0 \pm 0,6$ e $4,4 \pm 0,4$, respectivamente, mostrando que a dose de BE influencia no tempo para a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular.

No entanto, a maior dosagem de BE no início do protocolo não influenciou o diâmetro do folículo dominante no dia 5 e 7 do protocolo. De acordo com o diâmetro médio do folículo dominante (8,4 mm) no dia 5 do protocolo especulamos que o início da nova onda de desenvolvimento folicular começou por volta de 2 dias após a aplicação do BE + P₄.

O tempo de início da nova onda de desenvolvimento folicular pode variar por diversos fatores e as respostas parecem ser afetadas pela raça e estágio da lactação ou gestação. Estes fatores são associados às diferenças em estado metabólico e às taxas de “clearance” hormonal. Assim, diferenças no “clearance” de estradiol da circulação provavelmente também influenciam o ponto em que as concentrações de estradiol na circulação deixam de ser capazes de manter a supressão do aumento de FSH pré-emergência e, portanto, do momento da nova onda folicular (DAY et al., 2010).

O diâmetro do folículo dominante no dia 5 do protocolo de IATF (5 dias após a aplicação de BE) foi de 8,4 mm, indicando que já houve a divergência folicular no momento da aplicação do ECP e do eCG. A divergência folicular ocorre com o diâmetro do folículo dominante em novilhas e vacas *Bos taurus indicus* de 5,4 a 6,2 mm, respectivamente e o intervalo entre a ovulação e a divergência foi de aproximadamente 2,7 dias (SARTORELLI et al., 2005). O tempo médio para apresentação do estro no experimento II foi de 2,4 dias, o que confirma que no dia 5 do protocolo de IATF as vacas já tinham passado pela divergência do folículo dominante.

O diâmetro do folículo dominante no dia 7 do protocolo foi de 10,3 e 11,2 mm no experimento I e II, respectivamente. O diâmetro médio nesta etapa do desenvolvimento folicular é condizente com o proestro, isso foi confirmado com o tempo médio de aparecimento de estro no experimento II que foi de 2,4 dias, além disso, o pico de estro neste experimento ocorreu com 48 h (dia 7 do protocolo). Trabalhos com indução do estro apenas com PGF_{2α} relatam folículos ovulatório ao redor de 11 mm de diâmetro em *Bos taurus indicus*

(FIGUEIREDO et al., 1997; BORGES et al., 2003). A taxa de crescimento folicular também foi condizente com os relatos da literatura. Borges et al. (2003) relataram que a taxa de crescimento do folículo de vacas Nelore após a PGF_{2α} até a ovulação foi de 1,2 mm/dia e Carvalho et al. (2008) relataram crescimento folicular de 0,9 e 1,1 mm/dia de novilhas submetidas a protocolo de IATF.

4.5 CONCLUSÃO

- A utilização do protocolo com 5 dias de P₄ + BE / ECP + eCG foi capaz de induzir 6,5 % de ovulação dupla em vacas Nelore.
- O tratamento A causou menor taxa de codominância que o tratamento B.
- Não houve diferença significativa entre os tratamentos A e B na taxa de ovulação, taxa de ovulação dupla, diâmetro do folículo dominante nos dias 5 e 7 do protocolo de 5 dias de P₄ e na taxa de crescimento do folículo dominante.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Effects of modified FSH surges on follicle selection and codominance in heifers. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 28-40, 2005.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA E. H.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R.; BÓ, G. A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. **Theriogenology**, v. 55, n. 1 p. 157, 2001. (Abstract)

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

BOGACZ, V. L.; HUSTON, J. E.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Identification of the optimal dose of estradiol benzoate in combination with a progestin to program follicular “turnover” in cyclic cattle. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. s. 1, p. 124, 1999 (Abstract).

BORGES, A. M.; TORRES, A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.276-283, 2003.

BRIDGES, G. A.; HESSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH to PGF_{2α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

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, n. 4, p. 647–658, 2003.

DAY, M. L.; BURKE, C. R.; PIRES, A. V. Uso de estradiol exógeno visando coordenar o crescimento folicular, estro e ovulação. In: PIRES, A. V. **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 653-663.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O. MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, 2005.

TRIBULO, H.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; GATTI, G.; TRIBULO, R.; CACCIA, M.; BÓ, G. A. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 1, 2002. (in press - Abstract)

Capítulo IV

Efeito da redução do tempo de exposição à P_4 utilizando os protocolos de 5 dias de P_4 + GnRH e de 7 dias de P_4 + BE + ECP e eCG

5 EFEITO DA REDUÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À P₄ UTILIZANDO OS PROTOCOLOS DE 5 DIAS DE P₄ + GNRH E DE 7 DIAS DE P₄ + BE + ECP E ECG

5.1 INTRODUÇÃO

Recentemente foi formulada a hipótese de que a diminuição do tempo de exposição à P₄ em protocolos de IATF aumentaria a taxa de concepção, pelo potencial aumento na produção de estradiol pelo folículo ovulatório (VALDEZ et al., 2005; BRIDGES et al., 2008). Este incremento poderá ocorrer em virtude do maior potencial que folículos jovens têm em secretarem estradiol, quando comparados com folículos mais velhos, e também em virtude de um intervalo maior entre a PGF_{2α} e a IA, abordagem que aumenta o tempo de pró-estro. Comparando o protocolo de 5 vs 7 dias de dispositivo de P₄, os folículos estariam com 3 a 4 dias vs 5 a 6 dias, respectivamente, de emergência no dia da remoção do dispositivo de P₄ (BURKE et al., 2001).

Sendo assim, Bridges et al. (2008) realizaram comparações entre o desempenho reprodutivo de vacas de corte Angus em lactação submetidas a sincronização de estro com o CO-Synch + P₄ por 7 dias (7dCO-Synch) e por 5 dias (5dCO-Synch) e observaram aumento na taxa de prenhez (59,9 vs 70,4%, respectivamente) no protocolo de 5 dias de P₄.

O objetivo do trabalho foi comparar a taxa de detecção de estro, a concentração de P₄ 8 dias após a IA, a taxa de ovulação e a taxa de prenhez dos protocolos de 7 dias de P₄ com estrógenos e com 5 dias de P₄ com GnRH em nulíparas, primíparas e múltíparas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação Experimental Agrozootécnica *Hildegard Georgina Von Pritzelwiltz* (latitude 23°34'25" sul e longitude 50°58'17"

oeste), no Município de Londrina – Paraná, pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, ligada a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP. Durante o experimento, os animais foram mantidos em regime de pasto formado de *Panicum maximum*, com suplementação de sal mineral *ad libitum*.

Quatrocentas e onze (411) fêmeas da raça Nelore foram divididas de acordo com a categoria em nulíparas (n = 198), primíparas (n = 80) e multíparas (n = 133), conforme mostra a Tabela 4. Todos os animais passaram por exame ginecológico por ultrassonografia no início do protocolo e apresentavam útero e ovários normais. Nesta avaliação, os animais que apresentavam CL no início do protocolo, foram distribuídos igualmente nos tratamentos.

Tabela 4 - Caracterização dos animais que participaram do experimento

	n	DPP(dias)	Idade(ano)	CL (%)	Peso(Kg)	ECC(1-5)
Multíparas	133	41,88 ±0,54	7,52 ±0,20	23,0	448,52 ±4,06	2,86 ±0,02
Primíparas	80	41,46 ± 0,58	3,91 ±0,03	0,0	391,40 ±3,89	2,78 ±0,01
Nulíparas	198	.	2,16	100,0	342,34 ±2,27	.

Número (n), dias pós-parto (DPP), idade, ciclicidade (CL), peso, e escore de condição corporal (ECC).

No protocolo de 7 dias de P₄, os animais receberam no dia 0 um implante de 1,9 g P₄ de segundo uso (CIDR[®], Pfizer, Brasil) e a dose 2 mg de BE (Estrogin[®], Farmavet, Brasil). Sete dias após, o dispositivo de P₄ foi retirado e aplicou-se 25 mg de Dinoprost trometamina (Lutalyse[®] Pfizer, Brasil), 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP) (E.C.P.[®], Pfizer, Brasil) e 300 IU de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Folligon[®], Intervet, Brasil), conforme mostra a Figura 13. No protocolo de 5 dias de P₄, os animais receberam no dia 0 um implante de P₄ de segundo uso (CIDR[®], Pfizer, Brasil) e 100 µg de GnRH (Fertagyl[®], Intervet, Brasil). Cinco dias após, o dispositivo foi retirado e aplicou-se 50 mg de Dinoprost trometamina – divididas em duas doses de 25 mg com intervalo de 6 horas (Lutalyse[®] Pfizer, Brasil). Os animais que não apresentaram estro até 55 h após a remoção do dispositivo de P₄, receberam 100 µg de GnRH (Fertagyl[®], Intervet, Brasil) no momento da IA (Figura 13). No dia da retirada do dispositivo de P₄, todos os animais receberam um adesivo

para detecção do estro (*Estrotest[®]*, Rockway Inc., Spring Valley, WI), sendo o adesivo avaliado duas vezes ao dia (AM e PM), durante 4 dias a partir da remoção do dispositivo de P_4 .

A IA foi realizada 55 h ou 72 h após a remoção do dispositivo de P_4 , dependendo da manifestação de estro. Os animais que apresentaram estro até 55 h passaram pela IA nesta hora. Os animais que não tinham apresentado estro até as 55 h foram IA em 72 h após a remoção do dispositivo de P_4 , apresentando ou não estro (Figura 13).

Figura 13 - Esquema dos protocolos de sincronização utilizados no experimento

A confirmação da ovulação foi realizada pela coleta de sangue e posterior dosagem de P_4 8 dias após a IA e foi considerado que a ovulação ocorreu quando a concentração de P_4 atingiu valores maiores que 1 ng/mL. A dosagem de progesterona foi realizada por quimioluminescência, através da utilização de kit's comerciais para IMMULITE[®] 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), a qual obteve um coeficiente de variação de 2,0 % para intra-ensaio e 4,3 % para o intra-teste. As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal – LNRA/ESALQ/USP.

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (considerando como bloco a categoria animal – nulíparas, primíparas e múltíparas) para a análise dos dados de todas as três categorias juntas. Foi utilizado o

delineamento inteiramente casualizado para a análise separada de cada categoria (nulíparas, primíparas e múltiparas). A concentração de P_4 foi analisada pelo procedimento MIXED e as outras variáveis pelo procedimento GLIMMIX, ambos os procedimentos do pacote estatístico SAS 9.3. Antes porém da análise pelo procedimento MIXED, foi verificado a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias, os dados que não atenderam essas premissas passaram por transformação logarítmica [$\log_{10} (x + 1)$] antes de serem analisados. Alguns dados discrepantes (*outliers* – resíduo estudentizado >3 ou <-3) foram retirados antes de proceder às análises. Ambos os procedimentos, GLIMMIX e MIXED são do pacote estatístico SAS 9.3. Foi considerado como diferença significativa quando o valor de P foi menor que 5 %.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Todos os animais

A taxa de prenhez foi maior no protocolo de 7 dias de P_4 comparado com o protocolo de 5 dias de P_4 (49,7 vs 35,4 %, respectivamente - $P = 0,0032$) (Tabela 5). A taxa de apresentação de estro também foi maior no protocolo de 7 dias (80,3 vs 36,4 % - $P <,0001$), mas não houve diferença na taxa de ovulação entre os protocolos de 5 e 7 dias de P_4 (90,2 vs 89,5 %, respectivamente - $P = 0,7901$). Os animais que foram submetidos ao protocolo de 7 dias de P_4 apresentaram um intervalo mais curto entre a remoção do dispositivo de P_4 e a manifestação do estro em comparação com o protocolo de 5 dias de P_4 (54,0 vs 70,8 h, respectivamente – $P <,0001$). A prenhez nos animais que apresentaram estro no protocolo de 5 dias, que foi mais baixa quando comparada com o protocolo de 7 dias de P_4 (38,6 vs 53,9 %, respectivamente - $P = 0,052$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nos protocolos de 5 (5D) e 7 (7D) dias de progesterona

	Tratamento		Média	Valor-P
	5 D	7 D		
Prenhez, %	35,4b (73/206)	49,7a (101/203)	42,5	0,0032
Estro, %	36,4b (75/206)	80,3a (164/204)	58,3	<,0001
Ovulação, %	90,2 (186/206)	89,5 (178/199)	89,9	0,7901
Tempo para estro, h	70,8 (75)	54,0 (89/165)	59,3	<,0001
Prenhez com estro, %	38,6 (29/75)	53,9 (88/163)	49,2	0,0620
Prenhez sem estro, %	33,5 (44/131)	32,5 (17/40)	49,2	0,8659

(n) – número de animais. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença significativa a 5 %.

O protocolo de 7 dias de P₄ foi capaz de propiciar maior concentração sérica de P₄ em comparação com o protocolo de 5 dias de P₄ (5,03 vs 4,33 %, respectivamente – P = 0,0427) (Tabela 6). Considerando apenas os animais que ovularam, o protocolo de 7 dias de P₄ também foi capaz de propiciar maior concentração sérica de P₄ em relação ao protocolo de 5 dias de P₄ (5,54 vs 4,74 %, - P = 0,0007) (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de Progesterona (ng/mL) oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P₄. Concentração de P₄ em cada protocolo levando em consideração os animais que ovularam e que ficaram prenhes

	Tratamento		Média	EPM	Valor-P
	5 D	7 D			
CP₄T	4,33b (204)	5,03a (204)	4,66	0,1174	0,0427
CP₄O	4,74b (184)	5,54a (166)	5,12	0,1049	0,0007
CP₄NO	0,57 (20)	0,53 (19)	0,55	0,0386	0,7729
CP₄P	5,05 (72)	5,72 (92)	5,43	0,1470	0,1033
CP₄V	3,93 (132)	4,36 (92)	4,11	0,1634	0,3595

(n) – número de animais. CP₄T – Concentração progesterona total. CP₄O – Concentração de progesterona nos animais que ovularam. CP₄NO - Concentração de progesterona nos animais que não ovularam. CP₄P – Concentração de progesterona nas fêmeas prenhas. CP₄V - Concentração de progesterona nas fêmeas vazias. EPM – Erro padrão da média Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Os animais que engravidaram apresentaram maior concentração de P_4 8 dias após a IA quando comparado com as fêmeas que ficaram vazias ($5,5 \pm 0,1$ vs $4,8 \pm 0,1$ ng/mL, $P = 0,0003$) (Figura 14).

Figura 14 - Concentração de progesterona (P_4) oito dias após a IA das fêmeas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado ($P = 0,0003$)

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Os animais submetidos ao protocolo de 7 dias de P_4 começaram a apresentar estro 32 h após a remoção do dispositivo de P_4 e o início da manifestação do estro no protocolo de 5 dias de P_4 foi após 48 h da remoção do dispositivo de P_4 (Figura 15). O pico de estro no protocolo de 7 dias de P_4 ocorreu em 48 h após a remoção do dispositivo de P_4 , já no protocolo de 5 dias de P_4 , o pico de estro ocorreu em 80 h após a remoção do dispositivo de P_4 . No protocolo de 5 dias de P_4 a maioria dos animais não apresentaram estro (63,6 %).

Figura 15 – Distribuição do estro de acordo com os protocolos de 5 e 7 dias de progesterona

A taxa de prenhez em 55 h foi maior do que em 72 h (50,3 vs 37,5, respectivamente - $P = 0,0099$) (considerando todos os animais). A taxa de prenhez em 55 h dos animais submetidos ao protocolo de 7 dias de P_4 também foi maior que em 72 h (54,8 vs 39,1 %, respectivamente - $P = 0,0320$). A taxa de prenhez em 55 e 72 h foram semelhantes no protocolo de 5 dias de P_4 (22,7 vs 37,0 %, respectivamente - $P = 0,1956$) (Figura 16).

Figura 16 – Taxa de prenhez geral e nos protocolos de 5 e 7 dias de P_4 de acordo com o horário da inseminação artificial (55 e 72 h)

Médias seguidas de letras distintas, no mesmo tratamento, apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

5.3.2 Nulíparas

A taxa de prenhez das nulíparas não apresentou diferença significativa entre os protocolos de 5 e 7 dias de P_4 (41 vs 51 % - $P = 0,1608$) (Tabela 7). As nulíparas apresentaram mais estro no protocolo de 7 dias (95 vs 66 % - $P < 0,0001$), mas não houve diferença na taxa de ovulação nos protocolos de 5 e 7 dias de P_4 (94 vs 91 % - $P = 0,5013$). Um dado não esperado foi a prenhez nos animais que apresentaram estro no protocolo de 5 dias de P_4 , que foi mais baixa quando comparada com o protocolo de 7 dias de P_4 (36,0 vs 52,1 % - $P = 0,052$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro das nulíparas nos protocolos de 5 (5D) e 7 (7D) dias de progesterona

	Tratamento		Média	Valor-P
	5 D	7 D		
Prenhez, %	41,0 (41/100)	51,0 (49/96)	45,9	0,1608
Estro, %	66,0b (66/100)	95,8a (93/97)	80,7	<0,0001
Ovulação, %	93,9 (93/99)	91,3 (85/93)	92,7	0,5013
Prenhez com estro, %	36,3 (24/66)	52,1 (48/92)	45,5	0,0520
Prenhez sem estro, %	50,0 (17/34)	25,0 (1/4)	47,36	0,3678

(n) – número de animais. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Não houve diferença ($P = 0,4499$) na concentração de P_4 das nulíparas nos protocolos de 5 e 7 dias de P_4 , conforme mostra a Tabela 8. Não houve diferença na concentração de P_4 entre as nulíparas que ovularam ($P = 0,1279$) e que ficaram prenhes ($P = 0,3257$).

Tabela 8 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das nulíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P₄. Concentração de P₄ em cada protocolo levando em consideração as nulíparas que ovularam e que ficaram prenhes

	Tratamento		Média	EPM	Valor-P
	5 D	7 D			
CP₄T	4,02 (99)	4,23 (87)	4,12	0,1379	0,4499
CP₄O	4,24 (93)	4,62 (79)	4,41	0,124	0,1279
CP₄NO	0,60 (6)	0,37 (8)	0,47	0,0667	0,0918
CP₄P	4,45 (41)	4,80 (44)	4,63	0,1779	0,3257
CP₄V	3,71 (58)	3,66 (42)	3,69	0,1974	0,8997

(n) – número de animais em cada análise. CP₄T – Concentração progesterona total. CP₄O – Concentração de progesterona nos animais que ovularam. CP₄NO - Concentração de progesterona nos animais que não ovularam. CP₄P – Concentração de progesterona nas fêmeas prenhas. CP₄V - Concentração de progesterona nas fêmeas vazias. EPM – Erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Não houve diferença na concentração de P₄ das nulíparas que ficaram prenhas em comparação com as que ficaram vazias, independente do protocolo utilizado (4,63 vs 4,22 ng/mL, respectivamente – P = 0,1215) (Figura 17).

Figura 17 - Concentração de progesterona (P₄) oito dias após a IA das nulíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado (P = 0,1215)

No protocolo de 7 dias de P_4 as nulíparas começaram a apresentar estro 32 h após a remoção do dispositivo de P_4 . No protocolo de 5 dias de P_4 , as nulíparas começaram a apresentar estro 48 h após a remoção do dispositivo de P_4 (Figura 18). Nos protocolos de 5 e 7 dias de P_4 o pico de estro ocorreu em 72 e 80 h, respectivamente após a remoção do dispositivo de P_4 .

Figura 18 – Distribuição de estro das nulíparas

5.3.3 Primíparas

A porcentagem de prenhez não diferiu entre os protocolos de 5 e 7 dias de P_4 (25,6 vs 31,7 %, respectivamente – $P = 0,5513$). A taxa de detecção de estro no protocolo de 7 dias de P_4 foi de 48 %. No protocolo de 5 dias de P_4 nenhuma das primíparas apresentaram estro. Não houve diferença na taxa de prenhez dos animais que não apresentaram estro ($P = 0,8764$) em relação aos protocolos utilizados (Tabela 10).

Tabela 9 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nas primíparas nos protocolos de 5 (5 D) e 7 (7 D) dias de progesterona

	Tratamento		Média	Valor-P
	5 D	7 D		
Prenhez,%	25,6 (10/39)	31,7 (13/41)	28,7	0,5513
Estro,%	0,0 (0/39)	48,7 (20/41)	25,0	0,0
Ovulação,%	79,4 (31/39)	73,6 (28/38)	76,6	0,5501
Prenhez com estro, %	0,0	40,0 (8/20)	0,0	0,0
Prenhez sem estro, %	25,6 (10/39)	23,8 (5/21)	25,0	0,8764

(n) – número de animais.

Não houve diferença na concentração de P4 dos animais submetidos aos protocolos com 5 ou 7 dias de P4 ($P = 0,5471$) (Tabela 11). No entanto, quando se compara a concentração de progesterona das primíparas que ovularam aos protocolos, observa-se que o protocolo de 7 dias de P4 proporcionou maior concentração de P4 em comparação com o protocolo de 5 dias de P4 (6,81 vs 4,94 ng/mL, respectivamente – $P = 0,0033$) (Tabela 11). As primíparas que ficaram prenhas no protocolo de 7 dias de P4 também apresentaram concentração de P4 maior em comparação com as primíparas submetidas ao protocolo de 5 dias de P4 (7,56 vs 5,75 %, respectivamente – $P = 0,0259$) (Tabela 11).

Tabela 10 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das primíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P₄. Concentração de P₄ em cada protocolo levando em consideração as primíparas que ovularam e que ficaram prenhes

	Tratamento		Média	EPM	Valor-P
	5 D	7 D			
CP₄T	3,95 (36)	4,96 (33)	4,43	0,349	0,5471
CP₄O	4,94b (28)	6,81a (23)	5,79	0,2877	0,0033
CP₄NO	0,47b (8)	0,68a (10)	0,59	0,0549	0,0422
CP₄P	5,75b (10)	7,56a (10)	6,65	0,4139	0,0259
CP₄V	3,25 (26)	3,82 (23)	3,52	0,395	0,9057

(n) – número de animais. CP₄T – Concentração progesterona total. CP₄O – Concentração de progesterona nos animais que ovularam. CP₄NO - Concentração de progesterona nos animais que não ovularam. CP₄P – Concentração de progesterona nas fêmeas prenhas. CP₄V - Concentração de progesterona nas fêmeas vazias. EPM – Erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

A concentração de progesterona 8 dias após a IA das primíparas que emprenharam foi maior quando comparado com as primíparas que ficaram vazias (6,65 vs 5,22 ng/mL, respectivamente – P = 0,0071) (Figura 19).

Figura 19 - Concentração de progesterona (P₄) oito dias após a IA das primíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado (P = 0,0071)

Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

Nenhuma das primíparas apresentaram estro no protocolo de 5 dias de P_4 . As primíparas expressaram 48,8 % de estro entre 48 e 72 h após a remoção do dispositivo de P_4 (Figura 20).

Figura 20 – Distribuição do estro das primíparas submetidas aos protocolos de 5 e 7 dias de progesterona

5.3.4 Multíparas

A taxa de prenhez das múltiparas submetidas ao protocolo de 5 dias de P_4 foi menor em comparação com as múltiparas submetidas ao protocolo de 7 dias de P_4 (32,8 vs 58,4 %, respectivamente - $P = 0,0041$). Isso foi reflexo da taxa de manifestação de estro, que foi maior no protocolo de 7 dias de P_4 , quando comparado com o protocolo de 5 dias de P_4 (76,9 vs 13,4 %, respectivamente - $P < 0,0001$). As taxas de prenhez das múltiparas que apresentaram e que não apresentaram estro não diferiram entre os protocolos. As múltiparas que apresentaram estro tiveram maior taxa de prenhez em comparação com as múltiparas que não apresentaram estro (61,0 vs 32,0 %, respectivamente - $P = 0,0018$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Taxa de prenhez, de estro, de ovulação, de prenhez com estro e prenhez sem estro nas multíparas nos protocolos de 5 (5 D) e 7 (7 D) dias de progesterona

	Tratamento		Média	Valor-P
	5 D	7 D		
Prenhez, %	32,8b (22/67)	58,4a (38/65)	45,4	0,0041
Estro, %	13,4b (9/67)	76,9a (50/65)	44,6	<0,0001
Ovulação, %	91,0 (61/67)	96,9 (63/65)	93,9	0,1785
Prenhez com estro, %	55,5 (5/9)	62,0 (31/50)	61,0	0,7170
Prenhez sem estro, %	29,3 (17/58)	46,6 (7/15)	32,0	0,2116

(n) – número de animais. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

As multíparas submetidas ao protocolo de 5 dias de P₄ apresentaram a concentração de P₄ menor que as multíparas submetidas ao protocolo de 7 dias de P₄ (5,3 vs 6,67 ng/mL, respectivamente – P = 0,0006). A concentração de P₄ das multíparas que ovularam também foi menor no protocolo de 5 dias de P₄ comparado com o protocolo de 7 dias P₄ (6,86 vs 5,76 ng/mL, respectivamente - P = 0,0013). Não houve diferença na concentração de P₄ das vacas que emprenharam nos dois protocolos, no entanto, as vacas que ficaram vazias no protocolo de 5 dias de P₄ apresentaram a concentração de P₄ menor do que as vazias no protocolo de 7 dias de P₄ (4,88 vs 6,73 ng/mL, respectivamente – P = 0,0037) (Tabela 13).

Tabela 12 - Concentração de Progesterona (ng/mL) das multíparas oito dias após a IA nos protocolos de 7 (7 D) e 5 (5 D) de P₄. Concentração de P₄ em cada protocolo levando em consideração as multíparas que ovularam e que ficaram prenhes

	Tratamento		Média	EPM	Valor-P
	5 D	7 D			
CP₄T	5,30b (66)	6,67a (64)	5,97	0,2025	0,0006
CP₄O	5,76b (60)	6,86a (62)	6,32	0,1741	0,0013
CP₄NO	0,68 (6)	0,60 (2)	0,66	0,0547	0,5741
CP₄P	6,13 (22)	6,61 (38)	6,44	0,2289	0,3085
CP₄V	4,88b (44)	6,73a (26)	5,57	0,3145	0,0037

(n) – número de animais em cada análise. CP₄T – Concentração progesterona total. CP₄O – Concentração de progesterona nos animais que ovularam. CP₄NO - Concentração de progesterona nos animais que não ovularam. CP₄P – Concentração de progesterona nas fêmeas prenhas. CP₄V - Concentração de progesterona nas fêmeas vazias. EPM – Erro padrão da média. Médias seguidas de letras distintas apresentam diferença estatística ao nível de significância de 5 %.

A concentração de P₄ 8 dias após a IA não diferiu entre as multíparas que ficaram prenhas comparado com as multíparas que ficaram vazias (P = 0,9705), independente do protocolo utilizado (Figura 21).

Figura 21 - Concentração de progesterona (P₄) das multíparas prenhas e vazias, independente do protocolo empregado (P = 0,9705)

As multíparas que foram submetidas ao protocolo de 7 dias de P₄ apresentaram estro entre 48 até 80 h e o pico de estro foi em 48 h após a remoção do dispositivo de P₄ (Figura 22).

Figura 22 – Distribuição do estro das múltiparas submetidas aos protocolos de 5 e 7 dias de P_4

5.4 DISCUSSÃO

O protocolo de 5 dias de P_4 proporcionou menor taxa de estro, menor concentração de P_4 oito dias após a ovulação e, por conseguinte, menor taxa de prenhez. Estas diferenças devem-se à resposta das primíparas e múltiparas a este protocolo. O protocolo de 5 dias de P_4 pode ter sido pior nestes animais pois usa o GnRH para induzir a ovulação.

A concentração de P_4 8 dias após a IA foi menor nas primíparas e múltiparas submetidas ao protocolo de 5 dias de P_4 . Então especulamos que essas duas categorias, principalmente as primíparas, estavam em balanço energético negativo por estarem recém-paridas. Outro índice que justifica essa afirmação foi a baixa taxa de estro observada nas primíparas e múltiparas submetidas ao protocolo de 5 dias de P_4 . Os efeitos do balanço energético negativo sobre a fertilidade bovina parecem ser mediados por alterações metabólicas e endócrinas, as quais resultam em mudanças na atividade ovariana e produção de P_4 pelo CL (BEAM; BUTLER, 1999). Vacas em balanço energético negativo têm menores concentrações plasmáticas de glicose, insulina e IGF-I e apresentam ainda uma menor pulsatilidade de LH e baixas concentrações de P_4 no plasma (BEAM; BUTLER, 1999).

O GnRH utilizado para induzir a ovulação no protocolo de 5 dias de P_4 foi eficiente e causou alta taxa de ovulação neste protocolo. A indução da ovulação com GnRH aumenta a concentração sérica de IGF-I e esse aumento é dependente da dieta, ou seja, quanto melhor alimentado o animal, maior a

concentração sérica de IGF-I (ARMSTRONG et al., 2002). O aumento do IGF-I está intimamente relacionado com a esteroidogênese, pois aumenta a quantidade de receptores para FSH no folículo, aumentando a esteroidogênese (LUCY, 2000). Outros estudos mostraram que animais alimentados com baixo teor de energia na dieta têm maior expressão de RNA mensageiro para IGFBP-2 e IGFBP-4 nas células da granulosa em comparação com animais alimentados com alto teor de energia na dieta. Assim, com menor expressão de IGFBP-2 e 4 haveria maior biodisponibilidade de IGF-I, aumentando a esteroidogênese (ARMSTRONG et al., 2001; ARMSTRONG et al., 2002).

O uso do eCG e do ECP para a indução da ovulação em protocolos de IATF ocasiona maior crescimento dos folículos (SALES et al., 2012), pois o eCG estimula a produção de estrógeno pelas células da granulosa do folículo (BARUSELLI et al., 2004). A ovulação de um folículo pequeno resulta em um pequeno CL com baixa capacidade de produção de P_4 e consequentemente baixa taxa de prenhez, o que pode ter ocorrido no protocolo de 5 dias de P_4 (VASCONCELOS et al., 2001; PERRY et al., 2005).

Altas concentrações de P_4 nos primeiros dias após a IA são desejáveis, pois isso faz com que haja maior crescimento do embrião (CATER et al., 2008) e maior secreção de interferon-tau (MANN et al., 1999), evitando perdas por falha no reconhecimento materno da gestação e, por conseguinte, aumento na taxa de gestação e de sobrevivência embrionária (BELTMAN et al., 2009). Já é consenso na literatura que a aquisição da capacidade ovulatória dos folículos depende, em grande parte, do seu tamanho (PERRY et al., 2005). O diâmetro mínimo para induzir a ovulação sem prejuízo para a fertilidade de folículos em *Bos taurus indicus* é de 10 mm (SARTORI et al., 2001; SÁ FILHO et al., 2010). Provavelmente as multíparas e as primíparas, categorias que estavam em balanço energético negativo, tiveram menor taxa de crescimento dos folículos sem a aplicação do eCG e do ECP, prejudicando a taxa de prenhez do protocolo.

Outro benefício da aplicação de eCG e ECP para induzir a ovulação é a prevenção de luteólise prematura nas primíparas e multíparas, uma vez que esses animais apresentavam-se em anestro (cerca de 40 DPP). A baixa secreção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório causa decréscimo na inibição dos receptores de ocitocina no endométrio uterino, ocasionando a luteólise

prematura (MANN; LAMMING, 2000). A administração de eCG e ECP no protocolo de 7 dias de P₄ pode estimular a esteroidogênese, prevenindo a luteólise prematura (MARTINEZ et al., 2005).

A categoria animal mais exigida nutricionalmente neste experimento foi as primíparas, reflexo disto foi a menor taxa de prenhez entre os protocolos (média de 28,7 %). Mesmo com a aplicação do eCG e do ECP para induzir o crescimento a ovulação dos folículos, os animais não responderam como esperávamos, o que pode ser comprovada pela menor concentração de P₄ oito dias após a IA nas primíparas que não emprenharam quando comparado com as primíparas prenhas (Figura 19).

No caso das nulíparas, categoria em balanço energético positivo, não houve prejuízo na taxa de prenhez com o protocolo de 5 dias de P₄. Isto pode ser comprovado pela taxa de prenhez das nulíparas que não expressaram estro e pela concentração de P₄ oito dias após a IA.

O protocolo de 7 dias de P₄ causou em todas as categorias (nulíparas, primíparas e múltiparas) um pico de manifestação de estro e 48 h após a remoção do dispositivo de P₄. Sales et al. (2012) encontraram pico de ovulação (cerca de 60 %) em 72 h após a remoção do dispositivo de P₄, utilizando um protocolo semelhante. Considerando o intervalo médio entre o estro e a ovulação de 28 h, o pico de estro ocorreu em 44 h (BÓ et al., 2003).

O pico de estro no protocolo de 5 dias de P₄ ocorreu em 80 h após a remoção do dispositivo de P₄ (considerando apenas as nulíparas, pois foi a única categoria que houve uma expressão significativa de estro). Nossos dados não são semelhantes ao encontrados por Bridges et al. (2008), que observaram o pico de estro utilizando o protocolo de 5 dias de P₄ em Angus em 48 e 60 h. Os zebuínos normalmente apresentam 3 ondas de desenvolvimento folicular e com isso a duração de uma onda de desenvolvimento folicular é menor que em taurinos. Deste modo, nós especulamos que isso possa ter ocorrido devido a uma baixa taxa de ovulação ao primeiro GnRH, fazendo com que muitas novilhas comesçassem uma nova onda de desenvolvimento folicular durante a exposição à P₄. Outra explicação para essa diferença é a taxa de crescimento do FD em zebuínos e taurinos, os taurinos têm taxa de crescimento do FD maior que zebuínos.

Os animais do protocolo de 7 dias de P_4 que foram IA em 55 h após a remoção do dispositivo de P_4 apresentaram maior taxa de prenhez quando comparados com os animais que passaram pela IA em 72 h. No entanto, esse dado deve ser visto com cautela, pois todos os animais que passaram por IA em 55 h apresentaram estro, o que não ocorreu nos animais que foram IA em 72 h. Esse grupo compreende os animais que apresentaram estro em 72 e 80 h e os animais que não apresentaram estro.

É consenso entre os autores que os animais que apresentam estro em protocolos de IATF apresentam maior taxa de prenhez (SÁ FILHO et al., 2011). Uma das causas da menor fertilidade nos animais que não apresentaram estro no protocolo de IATF é a menor esteroidogênese, isso faz com que esses animais tenham menor folículo ovulatório, menor pico de LH o que juntos vão causar menor concentração de P_4 no diestro subsequente, impactando diretamente na taxa de prenhez dos animais (PERRY et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2011). Não conseguimos encontrar o motivo da baixa taxa de prenhez das nulíparas que apresentaram estro no protocolo de 5 dias de P_4 , o que impactou diretamente no resultado do mesmo. Até por que, o estro destes animais pode ser considerado natural, uma vez que não se aplicou nenhum hormônio que aumenta a esteroidogênese.

5.5 CONCLUSÃO

- O protocolo de 7 dias de P_4 com estrógeno se mostrou superior na taxa de detecção de estro, na concentração de P_4 8 dias após a IA e na taxa de prenhez de multíparas e primíparas.
- Em nulíparas, não houve diferença na taxa de prenhez entre os dois protocolos e na concentração de P_4 8 dias após a IA.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; GARDNER, J. O.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 371-378, 2002.

ARMSTRONG, D. G.; McEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624–1632, 2001.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance effects on follicular development and first ovulation in postpartum cows. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 54, n. 5, p. 411-424, 1999.

BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1173–1179, 2009.

BRIDGES, G. A.; HESSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH to PGF_{2α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3-4, p. 161–174, 2001.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368–375, 2008.

LUCY M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 7, n. 83, p. 1635–1647, 2000.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175–180, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 317–328, 1999.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BO, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37–52, 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. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684–689, 2007.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 23–30, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C. P. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestometbased, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 651–658, 2010.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O. MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

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 of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

VALDEZ, K. E.; CUNEO, S.P.; GORDEN, P.J.; TURZILLO, A. M. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 597–603, 2005.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307–314, 2001.