MARCELO HENRIQUE DOS SANTOS

**Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de
permanência do CIDR® em fêmeas Nelore**

Pirassununga

2016

MARCELO HENRIQUE DOS SANTOS

**Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de permanência do
CIDR® em fêmeas Nelore**

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 (a)

Pirassununga

2016

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.3295
FMVZ

Santos, Marcelo Henrique dos
Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de permanência do CIDR® em
fêmeas Nelore / Marcelo Henrique dos Santos. -- 2016.
80 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga,
2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires.

1. IATF. 2. Progesterona. 3. CIDR reutilizado. 4. eCG. I. Título.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento do protocolo de 7 dias de implante de P4 em vacas Nelore lactantes", protocolado sob o CEUA nº 1310300914, utilizando 1200 Bovinos (1200 fêmeas), sob a responsabilidade de Alexandre Vaz Pires, foi aprovado na reunião de 11/02/2015, e 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.

We certify that the Research "Development of Protocol 7 days of P4 implant in lactating Nelore cows", protocol number CEUA 1310300914, utilizing 1200 Bovines (1200 females), under the responsibility Alexandre Vaz Pires, was approved in the meeting of day 02/11/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Marcelo Henrique dos

Título: Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de permanência do CIDR® em fêmeas Nelore

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 pelas oportunidades que surgiram em minha vida e pela força recebida para superar todas as dificuldades. Oportunidades essas que foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha família pelo apoio ininterrupto e todo tempo dedicados a me guiar pelo caminho justo e honesto.

À minha amada, Yura, pelo carinho, incentivo, paciência e compreensão. Por estar ao meu lado sempre, mesmo estando longe fisicamente.

Ao Prof. Dr. Juliano J. R. Fernandes, pela confiança, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, pela orientação, amizade e gratidão.

Aos amigos do LNRA, Marquinho, Ângelo, Marcão, Vinicius, Daniel, Renan, Alexandre Miszura, Gabi, Ana, José Alípio, Elisângela e Ana Paula, pelas oportunidades de aprendizado mútuo, companheirismo e amizade.

Aos estagiários Mari, Adriana, João, Saladinha, Pará (*in memoria*), Samuel, Ramon, Camila, Edvin, Murilo e Ruan pelo trabalho e dedicação.

À Prof. Dr^a. Ivanete Susin, e funcionários do SIPOC, pelo respeito e amizade.

À FEALQ e a Fazenda Figueira, pelo espaço e animais cedidos à realização dos experimentos.

Ao José Renato e funcionários da Fazenda Figueira, pela colaboração.

Ao Caio, Sr. Jaime e funcionários da Fazenda Cavalinho, pela confiança, trabalho em equipe e colaboração na realização dos experimentos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), pela oportunidade da participação no curso de mestrado.

Aos professores e funcionários do VNP, pelos ensinamentos e dedicação.

À CAPES e FAPESP pela bolsa de estudos e financiamento do projeto.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para fazer valer a pena todo empenho e esforço dedicados a este trabalho.

Muito obrigado!

Epígrafe

*“Nascer, morrer, renascer ainda e
progredir sempre, tal é a lei.”*

Allan Kardec

RESUMO

SANTOS, M. H. dos. **Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de permanência do CIDR® em fêmeas Nelore.** [Protocol development for TAI with 7 days of CIDR® in Nellore cows]. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O objetivo do experimento I foi avaliar a redução do tempo de permanência do dispositivo de P4 de 9 para 7 dias sob parâmetros reprodutivos de vacas Nelore. Foram utilizadas 674 vacas lactantes entre 40-60 dias pós parto que receberam no início do protocolo (d0) BE + CIDR. No momento da retirada do CIDR foi administrado PGF2 α , ECP e eCG. A IATF ocorreu 55 e 48 horas após a retirada do dispositivo nos tratamentos 7d-CIDR e 9d-CIDR, respectivamente. Dez dias após a IA foi realizada colheita de sangue para dosagem de P4 sérica e confirmação da ovulação. Vacas tratadas com 7d-CIDR apresentaram menor ($p < 0,01$) folículo ovulatório em relação ao 9d-CIDR. No entanto, a concentração de P4 pós-IA, taxas de ovulação, detecção de estro e prenhez não foram influenciadas pelo tempo de permanência do CIDR. Assim, o uso do CIDR por 7 dias promoveu desempenho reprodutivo semelhante em vacas Nelore comparado ao protocolo com 9 dias. O experimento II teve o objetivo de avaliar os efeitos da reutilização do CIDR por até 35 dias de uso em vacas e 42 dias em novilhas Nelore. Utilizou-se 749 vacas lactantes 40-60 dias pós parto e 92 novilhas púberes. No d0 os animais receberam BE + CIDR novo (CIDR1) ou previamente usado por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4), 28 (CIDR5) e 35 (CIDR6) dias. No momento da retirada do CIDR (d7) foi administrado PGF2 α , ECP, eCG e exame de US para mensuração do maior folículo (FD), além de colheita de sangue para dosagem de P4. A IATF ocorreu 55 horas após a retirada do dispositivo. O diâmetro do FD foi maior ($p < 0,01$) de acordo com o maior número de usos do CIDR nas vacas, a concentração de P4 reduziu nos CIDRs reutilizados porém se mantiveram acima de 1,5 ng/ml e a taxa de prenhez não foi afetada pela reutilização do dispositivo por até 5 vezes em vacas e o sexto uso em novilhas. O protocolo com 7 dias de permanência permite a reutilização do CIDR por até 6 vezes mantendo a mesma eficiência reprodutiva. No experimento III o objetivo foi avaliar se a aplicação do eCG dois dias antes da retirada do dispositivo aumenta o tamanho do FO, CL e taxa de prenhez. Foram utilizadas 681 vacas lactantes 40-60 dias pós

parto e 182 novilhas púberes. Os animais foram distribuídos em dois tratamentos com aplicação de eCG no quinto (5d-eCG) ou sétimo dia (7d-eCG). No d0, os animais receberam BE + CIDR e no dia 7 o CIDR foi retirado e administrado PGF2 α e ECP. Dez dias após a IA foi realizada US para mensuração do CL e colheita de sangue para dosagem de P4. A IATF ocorreu 55 horas após a retirada do dispositivo. O tratamento 5d-eCG aumentou ($p < 0,01$) o FO nas vacas em relação ao grupo 7d-eCG e o mesmo ocorreu nas novilhas. Em vacas, a concentração de P4 pós IA foi mais alta ($p = 0,04$) no 5d-eCG. Em novilhas o diâmetro do CL pós-IA foi maior ($p < 0,01$) no 5d-eCG. No entanto, a antecipação da aplicação do eCG foi eficiente em aumentar o folículo ovulatório no momento da IATF, mas não aumentou a taxa de prenhez.

Palavras-chave: IATF. Progesterona. CIDR reutilizado. eCG.

ABSTRACT

SANTOS, M. H. dos. **Protocol development for TAI with 7 days of CIDR® in Nellore cows.** [Desenvolvimento de protocolos para IATF com 7 dias de permanência do CIDR® em fêmeas Nelore]. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of the experiment I was to evaluate the reduction of the time of P4 device from 9 (9d-CIDR) to 7 (7d-CIDR) days and its impacts on reproductive parameters of Nellore cows. Six hundred and seventy-four suckling cows 40-60 days postpartum received EB + CIDR at d0 of the protocol. At CIDR removal, there were administered PGF_{2α}, ECP, eCG. The FTAI occurred 55 and 48 hours after device removal in the treatment 7d-CIDR and 9d-CIDR, respectively. Ten days after AI blood samples were collected for P4 analysis and ovulation rate. Cows of treatment 7d-CIDR showed lower ($p < 0.01$) ovulatory follicle (OF) than 9d-CIDR. The CIDR length in cows and heifers did not influence concentration of P4, ovulation rate, estrus detection rate and pregnancy rate. Thus, the use of CIDR by 7 days did not impacted reproductive result in suckling cows and Nellore heifers. The aim of experiment II was to evaluate the effects of the CIDR reuse up to 35 days in cows and heifers on reproductive characteristics. We used 749 suckling cows 40-60 days postpartum and 92 pubertal heifers. In d0 animals received EB + new CIDR (CIDR1) or previously used by 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4), 28 (CIDR5) and 35 (CIDR6) days. At CIDR removal were administered PGF_{2α}, ECP, eCG and US to measure the largest follicle (LF), and blood collection for P4 analysis. The TAI occurred 55 hours after device removal. The LF diameter was greater ($p < 0.01$) in CIDR reused in cows. P4 concentration was lower in CIDR reused, but was higher than 1.5 ng / mL, and the device reused up to 5 times in cows and 6 times heifers did not affect pregnancy rate. The 7d-CIDR protocol allowed the reuse of CIDR up to 6 times keeping the same efficiency of CIDR new. In the experiment III the objective was to evaluate whether the application of eCG two days before the device removal increases the size of OF, CL and pregnancy rates. Six hundred and eighty-one suckling cows 40-60 days postpartum and 182 pubertal heifers were used. The animals were divided into two treatments with eCG application in fifth (5d-eCG) or seventh day (7d-eCG) of

protocol. In d0, the animals received EB + CIDR and day 7 CIDR was removed and administered PGF2 α and ECP. Ten days after AI, US was performed to measure the size of CL and blood collection for P4 analysis. The TAI occurred 55 hours after CIDR removal. The treatment d5 eCG increased ($p < 0.01$) OF. In cows, the concentration of P4 after AI was higher ($p = 0.04$) in 5d-eCG. In heifers, the CL diameter was higher in 5d-eCG. However, the 5d-eCG did not increase ($p > 0.1$) pregnancy rate. The strategy of eCG application in d5 was efficient to increase ovulatory follicle, but did not increase pregnancy rate.

Keywords: FTAI. Progesterone. CIDR reused. eCG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tempo de vida dos gametas masculino e feminino e sua importância na fertilidade.	26
Figura 2 –	Concentração de eCG na corrente sanguínea de vacas que receberam 3000 e 1500 UI de eCG	29
Figura 3 –	Modelo esquemático dos protocolos e manejos executados segundo cada tratamento.	43
Figura 4 –	Modelo esquemático dos protocolos e manejos executados	55
Figura 5 –	Porcentagem de perdas do CIDR de acordo com o número de usos, CIDR novo (CIDR1) e reutilizados por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4) e 28 (CIDR5) dias	59
Figura 6 –	Taxa de prenhez na IATF de acordo com o sêmen de cada touro	59
Figura 7 –	Modelo esquemático dos protocolos e manejos a serem executados segundo cada tratamento.	69
Figura 8 –	Taxa de prenhez de acordo com a manifestação de estro em vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4.....	73
Figura 9 –	Probabilidade de prenhez de acordo com a concentração sérica de P4 dez dias após IATF de vacas Nelore lactantes.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de prenhez de acordo com os lotes tratados com protocolo de 7 ou 9 dias de permanência do CIDR46
Tabela 2 -	Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 ou 9 dias de dispositivo de P4 (CIDR).....46
Tabela 3 -	Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias com uso de CIDRs novos (CIDR1) e reutilizados por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4) e 28 (CIDR5).....60
Tabela 4 -	Parâmetros reprodutivos de novilhas Nelore púberes submetidas a protocolo com 7 dias de permanência de CIDRs reutilizados por 21 (CIDR4) e 35 (CIDR6) dias61
Tabela 5 -	Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4 com aplicação de eCG no d5 e d772
Tabela 6 -	Parâmetros reprodutivos de novilhas Nelore púberes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4 com aplicação de eCG no d5 e d773

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.	Cenário da pecuária de corte	19
2.2.	Manipulação hormonal do ciclo estral.....	19
2.2.1.	Etapas da manipulação do ciclo estral para IATF	19
2.3.	Protocolos de sincronização com uso de GnRH e PGF2α	21
2.4.	Importância da P4 para sincronização do estro e ovulação	22
2.4.1.	Reutilização de dispositivos de P4	24
2.4.2.	Momento adequado para IATF de acordo com número de usos do dispositivo e horário da IATF	26
2.5.	Gonadotrofina Coriônica equina (eCG)	27
2.5.1.	Características fisiológicas e estruturais da eCG	28
2.5.2.	Uso do eCG em reprodução de bovinos.....	29
	REFERÊNCIAS	31
3.	Capítulo I - Comparação entre protocolos de IATF com 7 vs. 9 dias de permanência do CIDR em vacas Nelore.	41
3.1.	INTRODUÇÃO.....	41
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.2.1.	Animais e Local	42
3.2.2.	Protocolos e manejos	42
3.2.3.	Colheita e análise de amostras	44
3.2.4.	Análise estatística	45
3.3.	RESULTADOS	45
3.4.	DISCUSSÃO	47
3.5.	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	50
4.	Capítulo II: Efeito da reutilização do CIDR em protocolo de IATF sobre desempenho reprodutivo.....	53
4.1.	INTRODUÇÃO.....	53
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.2.1.	Animais e Local	54

4.2.2.	Protocolos e manejos	54
4.2.3.	Colheita e análise de amostras	56
4.2.4.	Análise estatística	57
4.3.	RESULTADOS	57
4.4.	DISCUSSÃO	61
4.5.	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
5.	Capítulo III: Efeito da antecipação da aplicação do eCG no protocolo de 7 dias de CIDR	67
5.1.	INTRODUÇÃO	67
5.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	68
5.2.1.	Animais e Local	68
5.2.2.	Protocolos e manejos	68
5.2.3.	Colheita e análise de amostras	70
5.2.4.	Análise estatística	71
5.3.	RESULTADOS	71
5.4.	DISCUSSÃO	74
5.5.	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados recentes estima-se que o rebanho bovino brasileiro é composto por 206,5 milhões de cabeças. A maior parcela desse rebanho são zebuínos, principalmente da raça Nelore, com aproximadamente 65,5 milhões de vacas e 15 milhões de novilhas em idade reprodutiva (ANUALPEC, 2015). A predominância desse grupo genético deve-se a maior adaptabilidade às condições climáticas (alta temperatura e umidade) e à disponibilidade de alimentos encontrados no Brasil, cujas pastagens apresentam gramíneas tropicais com alta produtividade, mas tendem a menor qualidade comparado a gramíneas de clima temperado, principalmente devido a sazonalidade das diferentes regiões do Brasil. No entanto, apesar dessas características adaptativas dos zebuínos às condições tropicais, na grande maioria dos rebanhos brasileiros observa-se prejuízo à eficiência produtiva e reprodutiva, principalmente devido ao prolongamento do período de anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2009), falhas na detecção do estro e puberdade tardia (VIEIRA et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2008).

Uma das principais biotécnicas reprodutivas utilizadas atualmente em bovinos é a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Segundo Baruselli et al. (2004), para o estabelecimento do intervalo entre partos de 12 meses, torna-se fundamental o emprego da IATF, procedimento que proporciona uma alta taxa de serviço no início da estação de monta, além de tornar desnecessária a detecção de estro. Além disso, a IATF possibilita que vacas em anestro no período pós parto sejam induzidas à ciclicidade (WILTBANK et al., 2002). O principal hormônio em um programa de IATF responsável pelo retorno da ciclicidade em vacas é a progesterona (P4). O uso de um dispositivo de P4 permite sincronizar eficientemente a emergência de uma nova onda folicular, aumenta o suporte de gonadotrofinas aos folículos e impede ciclos de curta duração após a primeira ovulação pós-parto, consequentemente, aumenta a fertilidade nesses animais quando submetidos à IATF (WILTBANK et al., 2002).

Na maioria dos protocolos de IATF utilizados atualmente no Brasil em vacas de corte, o tempo de permanência dos dispositivos de progesterona variam entre 8 e 9 dias. Alguns autores formularam a hipótese de que a diminuição do tempo de exposição à P4 aumentaria a taxa de concepção, pelo aumento em potencial na produção de estradiol pelo folículo ovulatório (VALDEZ et al., 2005; BRIDGES et al.,

2008). Esse incremento pode ocorrer em virtude do potencial dos folículos jovens secretarem mais estradiol, quando comparados a folículos mais velhos, e também em virtude de um intervalo maior entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF (BURKE et al., 2001). Diante disso, formulou-se a hipótese de que protocolos utilizando dispositivo de P4 por 7 dias podem sincronizar eficientemente a ovulação de vacas de corte submetidas à IATF, tanto quanto ou melhor quando comparado ao de 8 ou 9 dias.

Com a redução do tempo de permanência do CIDR de 9 para 7 dias, surge a possibilidade de reutilizar esses dispositivos por mais vezes. A reutilização do CIDR no Brasil já é uma prática rotineira e bem aceita, pois não causa prejuízo a taxa de prenhez (MENEGETTI et al. 2009). Em protocolos com permanência de 9 dias de CIDR, o mesmo é reaproveitado por até 4 vezes (MENEGETTI et al. 2009), o que somando os usos temos 36 dias de uso de CIDR. Sendo assim, podemos inferir que o protocolo de 7 dias aumenta a possibilidade de reutilização do CIDR. O aumento do número de utilizações do CIDR pode reduzir os custos com a IATF e ainda melhorar os índices reprodutivos. Com os consecutivos usos, a concentração de P4 do CIDR vai reduzindo gradativamente, uma vez que vacas e/ou novilhas de corte submetidas à altas concentrações de P4 que apresentam desenvolvimento folicular e fertilidade comprometidas (KINDER et al., 1996; KOJIMA et al., 2003; PERES et al. 2009; PERRY 2007; SÁ FILHO 2010).

Além da utilização de P4 para tratamentos de animais com fertilidade comprometida, outro fator que tem afetado positivamente o sucesso dos protocolos de IATF é o uso de eCG (Gonadotrofina Coriônica equina). Nos protocolos de IATF utilizados atualmente, em fêmeas com alta incidência de anestro pós-parto o eCG é utilizado para estimular o crescimento do folículo dominante (FD) (SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2012) e incrementar a produção de P4 pelo CL pós IATF (PERES et al., 2009; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Nos protocolos de 7, 8 ou 9 dias de implante de P4, a aplicação de eCG é feita no momento da retirada do implante. Uma alternativa para incrementar ainda mais o crescimento folicular seria antecipar a aplicação de eCG em dois dias, que em protocolo de 8 dias de P4 aumentou o FD, o CL e a produção de P4 pelo mesmo (TORTORELLA et al., 2013). Diante da importância do tamanho do FD e sua capacidade esteroidogênica e do CL produzindo maior quantidade de P4 para manutenção da gestação, o aumento no tamanho dos

mesmos poderia aumentar a taxa de prenhez em vacas tratadas com eCG no dia 5 do protocolo de 7 dias de CIDR.

Diante dos pontos citados acima, o uso do protocolo de 7 dias de CIDR, reutilização do CIDR e antecipação do eCG foram propostos 3 experimentos para avaliar o protocolo de 7 dias de CIDR, cujos objetivos foram: I – avaliar a eficiência do protocolo de 7 dias de CIDR em comparação com o protocolo de 9 dias; II – reutilizar o CIDR por até 5 vezes (35 dias) em vacas e utilizar o sexto uso (42 dias) para sincronização de novilhas e avaliar os efeitos dessa reutilização sobre as características reprodutivas desses animais; III – avaliar o efeito da antecipação do eCG sobre o desenvolvimento do FD, CL e da taxa de prenhez.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cenário da pecuária de corte

O cenário do mercado pecuário brasileiro atual, apesar da crise política e econômica, demonstrou um aumento de 3,2% na produção de bezerros em 2014 comparado ao ano anterior. Considerando o rebanho de fêmeas aptas a reprodução (80 milhões) e a quantidade de bezerros produzidos em 2014 (55 milhões), temos que a produção foi por volta de 0,68 bezerros/vaca/ano (ANUALPEC, 2015), produção abaixo do ideal que seria 1 bezerros/vaca/ano. A valorização da carne bovina e do bezerro tem impulsionado o mercado pecuário nos últimos anos. De acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), as vendas de sêmen no setor de corte aumentaram de 5,5 para 8,6 milhões de doses vendidas nos últimos cinco anos, sendo que em 2014 o volume de vendas foi cerca de 10 - 15% maior em relação ao ano anterior. Isso mostra que a intensificação do sistema de produção de bezerros através das biotécnicas reprodutivas, principalmente a IATF tem sido um dos fatores essenciais para obter-se aumento da produtividade no sistema de cria.

2.2. Manipulação hormonal do ciclo estral

As principais funções dos tratamentos hormonais desenvolvidos para manipulação do ciclo estral é controlar e sincronizar o desenvolvimento folicular, a ovulação e a fase luteal. Isso possibilita a realização da IA em tempo fixo sem a necessidade de detecção de estro podendo ser empregada em vacas com anestro pós parto.

2.2.1. Etapas da manipulação do ciclo estral para IATF

Os protocolos de sincronização do estro e ovulação consistem basicamente em três etapas, sendo que em cada uma delas existe uma série de opções de tratamentos a serem utilizados.

A primeira fase consiste em iniciar uma nova onda de crescimento folicular nas fêmeas tratadas. Para isso, existem duas formas principais que se diferenciam pelo modo de ação. A primeira consiste em induzir a ovulação do folículo dominante por meio da aplicação de hormônios que aumentem a liberação de gonadotrofinas, principalmente GnRH (PURSLEY et al., 1995; BARROS et al., 2000). Outra forma de iniciar uma nova onda de crescimento folicular é através da indução de atresia folicular pela administração de estrógenos associado com a P4 (ROCHE et al., 1981; MACMILLAN et al., 1991; ADAMS, 1994).

A segunda etapa de um protocolo de sincronização consiste na redução das concentrações séricas de P4, dando início ao período de proestro e desenvolvimento do folículo ovulatório. A indução da luteólise é feita por meio da utilização de análogos de prostaglandina 2 α (PGF2 α), como Dinoprost trometamina ou Cloprostenol, e retirada da fonte exógena de P4. Para garantir uma luteólise eficiente utiliza-se a fonte de P4 por pelo menos 5 dias, melhorando a resposta ao protocolo de sincronização. Isso porque o tratamento com PGF2 α é ineficaz na indução de luteólise durante os primeiros 5 dias de estro ciclo (HENRICKS et al., 1974; BIEHL et al.; 2010), período no qual o CL ainda é jovem e não responde a PGF2 α .

A última etapa da manipulação do ciclo estral é a indução da ovulação do folículo dominante. A administração de hormônios, tais como gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou hormônio luteinizante (LH), tem ação direta sobre o folículo, ou aqueles que induzem um pico pré-ovulatório de LH, como GnRH e os ésteres de estradiol. É importante lembrar que o intervalo da aplicação à ovulação é dependente do fármaco utilizado, porém a eficiência é semelhante. Barros et al., (2000) não observaram diferença nas taxas de ovulação e prenhez para tratamentos utilizando benzoato de estradiol em substituição ao GnRH como indutor de ovulação em protocolo de IATF. Em outro estudo utilizando P4 associado com estradiol em vacas *Bos indicus* para sincronizar a onda folicular, compararam-se o uso do BE, ECP e GnRH como indutor de ovulação, resultando em taxa de ovulação, concepção e prenhez semelhantes (MENEGETTI et al., 2009).

2.3. Protocolos de sincronização com uso de GnRH e PGF2 α

Com intuito de reduzir a variação do momento da ovulação após tratamento com prostaglandina, alguns pesquisadores investigaram o emprego de análogos do GnRH seguido da aplicação de PGF2 α depois de 7 dias. O tratamento com GnRH promove a ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento, caso o mesmo esteja na fase de crescimento ou no início da fase estática, dando início a uma nova onda de crescimento folicular 2 a 3 dias depois (PURSLEY et al., 1995; BODENSTEINER et al., 1996). Pursley et al. (1995) também demonstraram que a sincronização do estro e da ovulação, pode ser aumentada quando se utiliza uma segunda dose de GnRH, 36-48 horas após a aplicação de PGF2 α , originando-se o protocolo “Ovsynch” (GnRH/ PGF2 α /GnRH).

Estudos com protocolo “Ovsynch” demonstram que animais apresentando condição anovulatória não respondem da mesma maneira em relação àqueles cíclicos. Segundo alguns autores, a taxa de concepção de fêmeas bovinas sincronizadas pelo protocolo “Ovsynch” pode apresentar variações de 26% a 55% (PURSLEY et al., 1995; PURSLEY et al., 1997; VASCONCELOS, 1998). Barros, (2000) trabalhou com protocolo “Ovsynch” em vacas Nelore lactantes (60 a 90 dias pós-parto) e não lactantes, ambas apresentavam CL ao início do protocolo. As taxas de prenhez para esses grupos foram de 47,7% e 44,9%, respectivamente. No entanto, quando testado em vacas em anestro, as taxas de prenhez foram de apenas 14,9%, mostrando que o “Ovsynch” pode apresentar bons resultados apenas em vacas que estejam ciclando (BARUSELLI et al.; 2002). De acordo com os trabalhos de Barros, (2000) e Baruselli et al., (2002) o protocolo “Ovsynch” pode apresentar baixa eficiência em vacas zebuínas lactantes criadas extensivamente. Segundo esses autores, na maioria dos rebanhos zebuínos não são encontradas altas taxas de ciclicidade ao início do protocolo, o que torna inviável a utilização do “Ovsynch” nesses rebanhos.

Dentre os diversos tipos de condição anovulatória, a mais comum é o anestro em vacas lactantes no período pós parto. Em vacas leiteiras essa condição ocorre em aproximadamente 60 % dos animais, as quais apresentam folículo ovulatório, porém, não ocorre ovulação (GUMEN et al., 2003; WILTBANK et al., 2002). Vacas em condição anovulatória deste tipo, provavelmente têm hipotálamo resistente aos efeitos de “feedback” positivo do estradiol, ou seja, não há estímulo para liberação do pico de

LH para que ocorra a ovulação (GUMEN & WILTBANK, 2002). No entanto, a redução da fertilidade não tem sido reportada à falta de ovulação após o primeiro GnRH, mas devido ao desenvolvimento de onda folicular pré-ovulatória em ambiente com baixa concentração de P4 (WILTBANK et al.; PURSLEY & MARTINS, 2012).

Em busca de um protocolo com máxima sincronização e alta fertilidade para ser utilizado em fêmeas no pós parto curto (< 80 dias), desenvolveu-se o CO-Synch + P4. Um dos protocolos mais utilizados do mundo, baseia-se na aplicação de GnRH associado a uma fonte exógena de P4 para sincronização da emergência de uma nova onda folicular, aplicação de PGF2 α para luteólise e uma segunda aplicação de GnRH para induzir a ovulação (BRIDGES et al., 2010). Tem-se obtido com este protocolo, taxas de gestação que variam de 30 a 65% (BRIDGES et al., 2010; KASIMANICKAM et al., 2006). Um dos fatores que tem impacto na taxa de gestação do CO-Synch + P4 é o tempo de permanência da fonte exógena de P4 no animal. Nesse sentido, desenvolveu-se um CO-Synch + P4 reduzindo de 7 para 5 dias o tempo de permanência do dispositivo de P4 para maximizar o intervalo da retirada do dispositivo de P4 até a IATF (BRIDGES et al., 2008; WHITTIER et al., 2010). O maior tempo de proestro está relacionado com um potencial do folículo pré-ovulatório produzir maior concentração de estradiol, fator que tem sido relacionado com incrementos na taxa de gestação, por resultar em melhora na fertilidade após a ovulação induzida (BRIDGES et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2009; WHITTIER et al., 2010). No Brasil este protocolo é pouco utilizado, por dois motivos, devido ao alto custo do GnRH em relação ao estrógeno e pelo uso de estrógeno ser permitido aqui, ao contrário de outros países onde não tem o estrógeno como uma opção para IATF.

2.4. Importância da P4 para sincronização do estro e ovulação

A ação da progesterona na sincronização do ciclo estral em bovinos tem sido relatada há décadas (LAMOND et al., 1969 e GORDON et al., 1976). Os animais recebiam aplicações diárias de P4 em diferentes dosagens por períodos de até 20 dias. Esses tratamentos resultavam em sincronização do ciclo de forma aceitável, porém apresentavam baixa fertilidade.

Outras linhas de pesquisa se desenvolveram na mesma época com uso oral, injetável ou intradérmico de progestágenos sintéticos mais potentes (HANSEL, 1967; JÖCHLE, 1972). Nos anos 60 também ocorreu o desenvolvimento do Acetato de Melengestrol (MGA), análogo da P4 com efeito sobre o ciclo estral, com inibição da ovulação (DUNCAN et al., 1964). Devido a praticidade da administração oral, o MGA tornou-se o progestágeno mais utilizado no controle do ciclo estral, mas sua eficiência dependia de um consumo individual adequado, o que tornou-se a principal limitação da sua utilização.

Os avanços utilizando progesterona continuaram com o desenvolvimento e teste do dispositivo intravaginal liberador de progesterona (PRID - WEBEL, 1976). Este dispositivo contendo 1,55 g de P4 era utilizado sozinho ou combinado com benzoato de estradiol ou PGF2 α (ROCHE et al., 1981).

O sistema chamado CIDR (*Controlled Internal Drug Release*) foi primeiramente desenvolvido com um dispositivo contendo 1,9 g de P4 e uma capsula gelatinosa contendo 10 mg de BE a qual era inserida junto com o CIDR (MACMILLAN et al., 1991). Essa combinação do efeito da P4 inibindo a frequência de pulsos de LH com o efeito luteolítico do estrógeno permite a sincronização de uma nova onda de desenvolvimento folicular (ADAMS, 1994). Nos primeiros estudos o CIDR era mantido por 15 dias de permanência para sincronização do estro e ovulação em vacas apresentando anestro pós parto (MACMILLAN e PETERSON, 1993). A medida que outros estudos foram realizados, o tempo de permanência foi sendo reduzido, porém preservou-se os efeitos desejáveis sobre a sincronização da onda folicular.

Atualmente existe uma variedade de produtos eficientes na liberação de P4 com o objetivo de sincronizar o estro ou a ovulação ou induzir ovulação em novilhas pré-púberes. As formas de administração de P4 existentes são por meio de esponjas intravaginais impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou progesterona natural; administração de progestágenos no alimento com MGA; implantes subcutâneos com Norgestomet e dispositivos intravaginais de silicone com liberação lenta de progesterona como PRID, DIB ou CIDR (GREGORY et al., 2002; MORAES et al., 2002).

O tempo de permanência dos dispositivos de liberação lenta depende do tipo de protocolo utilizado e do animal tratado, podendo variar de 5 a 14 dias. O objetivo desses tratamentos é manter níveis de P4 circulantes >1 ng/ml durante a permanência do dispositivo, quantidade suficiente para suprimir a liberação endógena do pico de

LH, simulando a fase lútea do ciclo estral (LONG et al., 2009). Portanto, baixos níveis de P4 sérica durante tratamento com CIDR permite haver desenvolvimento normal da onda folicular culminando com posterior ovulação.

Em novilhas púberes, vacas lactantes ou não lactantes o dispositivo geralmente é mantido por 7 a 9 dias sem que ocorra redução na fertilidade. Em estudo realizado em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) tratadas com CIDR (1,9 g de P4), não observaram diferença nos tratamentos com 7 ou 8 dias de permanência do CIDR (YELICH et al., 2002). Outros estudos também não encontraram diferença em relação ao grupo tratado com CIDR por 8 (52,7%, 77/146) ou 7 (46,6%, 71/146) dias (BÓ et al., 2001; CHESTA et al., 2003). Quando avaliou-se tratamentos com tempos de permanência do dispositivo em vacas Nelore com 40-60 dias pós parto, Vasconcelos e Sá Filho (2008) encontraram taxas de concepção semelhantes entre os grupos tratados (67,5% [158/234] vs. 61,6% [143/232] para os tratamentos com 7 e 9 dias, respectivamente; $p > 0,1$). Diante disso, a literatura tem mostrado não haver influência negativa da redução do período de permanência do dispositivo de P4 sobre a fertilidade de vacas de corte. Apesar de ter relatos de trabalhos usando 7 dias de implante de P4 em fêmeas Nelore (VASCONCELOS & SÁ FILHO, 2008; MARTINS et al., 2014), ainda não foi feito um estudo bem abrangente sobre o assunto.

Outra função da P4 no protocolo de IATF é evitar a luteólise prematura em vacas que estão em anestro pós-parto e induzir ciclicidade em novilhas pré-púberes. Vacas leiteiras em anestro apresentam ciclo de curta duração após a primeira ovulação pós-parto (8 a 12 dias) devido à liberação prematura de prostaglandina pelo útero. O tratamento com P4 nessas vacas atrasa a liberação de prostaglandina para 16 a 18 dias pós-ovulação, resultando em um ciclo estral de duração normal (WILTBANK et al., 2002). Outro estudo realizados com novilhas pré púberes, indicam que o tratamento prévio com dispositivo intravaginal de P4 foi capaz de induzir ciclicidade em novilhas Nelore (SÁ FILHO et al., 2006).

2.4.1. Reutilização de dispositivos de P4

Estudo realizado por Long et al. (2009) afirma que o CIDR previamente usado por 7 dias pode ser reutilizado por igual período mantendo concentrações plasmáticas

de P4 superiores a 1,0 ng/mL, para sincronização de estros em vacas *Bos taurus*. Neste estudo, as concentrações plasmáticas de P4 no dia seguinte à inserção do CIDR, em vacas ovariectomizadas, foram de $4,0 \pm 0,1$; $2,4 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,2$ para o dispositivo novo, previamente usado por 7 e 14 dias, respectivamente. Os autores assumiram que a absorção de P4 através da mucosa vaginal declina gradualmente até o final do período de tratamento. Estudo semelhante realizado em novilhas Nelore ovariectomizadas demonstrou concentrações médias de P4 durante tratamento com CIDR novo ($3,8 \pm 0,2$ ng/mL), previamente usado por 8 ($2,3 \pm 0,1$ ng/mL) e 16 ($2,0 \pm 0,1$ ng/mL) dias (SALES et al., 2015). Neste estudo a concentração sérica de P4 foi superior a 1,5 ng/mL em todas as novilhas tratadas.

A reutilização dos dispositivos de P4 tem sido uma estratégia adotada a campo para viabilizar economicamente a IATF. Há um consenso na literatura em relação ao desempenho reprodutivo de fêmeas tratadas com dispositivos intravaginais previamente utilizados. Os trabalhos têm mostrado que o uso de CIDR previamente utilizado por até 27 dias não influenciou o desenvolvimento folicular ($10,99$ e $11,55$ mm; $p > 0,1$), taxa de ovulação ($79,71\%$ [55/69] e $85,71\%$ [90/105]; $p > 0,1$), taxa de concepção ($54,54\%$ [30/55] e $57,77\%$ [52/90]; $p > 0,1$) e taxa de prenhez ($43,48\%$ [30/69] e $49,52\%$ [52/105]; $p > 0,1$) em vacas no pós-parto tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 27 dias, respectivamente (SÁ FILHO e VASCONCELOS, 2008). Da mesma forma, Meneghetti et al. (2009) trabalhando com vacas Nelore com 40-110 dias pós parto, encontraram taxas de prenhez semelhantes (CIDR novo – $43,5\%$ [30/69] vs. CIDR4 – $49,5\%$ [52/105]; $p > 0,1$) quando utilizaram dispositivo previamente utilizado por 27 dias.

Em novilhas zebuínas pré-púberes submetidas a estação de monta com IA após detecção visual de estro o dispositivo previamente utilizado aumentou o diâmetro folicular (CIDR novo - $9,72$ mm e CIDR4 - $11,42$ mm; $p < 0,05$) e taxa de prenhez aos 90 dias (CIDR novo - $72,6\%$ e CIDR4 - $83,7\%$; $p < 0,05$) (CLARO JUNIOR et al., 2010). Isso também foi observado por Peres et al. (2009) quando submeteram novilhas púberes a protocolo com CIDR novo ou previamente utilizado por 18 dias e encontrou diâmetro folicular ($11,61 \pm 0,11$ mm vs. $12,05 \pm 0,12$ mm $p < 0,05$), respectivamente. Porém, com taxa de prenhez semelhante ($45,6\%$ [258/566] vs. $44,3\%$ [260/587]), respectivamente. A literatura sugere que a alta concentração de P4 circulante pode reduzir a frequência de LH comprometendo o crescimento folicular e a taxa de ovulação em novilhas submetidas a protocolos de IATF (BERGFELD et al., 1995;

CARVALHO et al., 2008). Diante disso, a reutilização dos dispositivos de P4 tornou-se uma alternativa muito comum para reduzir custos e viabilizar os protocolos de IATF.

2.4.2. Momento adequado para IATF de acordo com número de usos do dispositivo e horário da IATF

O número de usos do dispositivo e o momento em que as fêmeas são inseminadas em tempo fixo parecem estar relacionados com o momento da ovulação. Alguns trabalhos relatam a existência de momentos mais adequados para se realizar a IA em relação a ocorrência da ovulação. Isso vai depender da viabilidade do oócito e da sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (HUNTER, 1994). Sabe-se que a probabilidade de ocorrer a concepção reduz à medida que a inseminação é realizada muito próxima ao momento da ovulação (DRANSFIELD et al., 1998). As chances diminuem ainda mais quando a IA é realizada em fêmeas que já ovularam. Com objetivo de maximizar a disponibilidade de espermatozoides aptos à fecundação do ovócito, a IA deve ocorrer próximo ao momento da ovulação, cerca de 12 horas após o início do estro, porém não tão tardiamente de modo que o ovócito envelheça (DALTON e SAACKE, 2007) (Figura 1).

Figura 1 – Tempo de vida dos gametas masculino e feminino e sua importância na fertilidade.

Adaptado de Dalton e Saacke (2007).

Em vacas lactantes, a ocorrência das ovulações após o uso de protocolos a base de BE + P4 parece ser influenciada pelo número de usos das fontes de P4. Em

estudo com vacas *Bos indicus* lactantes tratadas com dispositivos intravaginais previamente utilizados por 16 dias observou-se menor intervalo da retirada do dispositivo à ovulação ($68,0 \pm 2,0h$) em relação às fêmeas tratadas com dispositivos novos ($74,4 \pm 1,6h$) (CREPALDI, 2009). Esse efeito do número de reutilizações da fonte de P4 sobre o momento da ovulação pode influenciar a fertilidade de fêmeas submetidas à IATF dependendo do momento em que essas fêmeas são inseminadas.

Em busca de momentos mais adequados para se realizar a IATF em relação a ocorrência da ovulação, alguns estudos foram conduzidos para verificar a taxa de prenhez em vacas tratadas com dispositivos intravaginais e submetidas a diferentes momentos de inseminação. Em vacas de corte submetidas a tratamento com BE + P4 e examinadas por ultrassonografia observaram que a ovulação ocorre em média de 66 (CUTAIA et al., 2003) à 68,5 horas (SALES et al., 2012) após a retirada do dispositivo de P4. Cutaia et al., (2003) também avaliaram o melhor momento para IATF em protocolos de 7 dias de P4 e não observaram diferença em inseminar 48 (45,5% [96/211] ou 54 (51,4% [108/210] horas após a retirada do dispositivo. Outro estudo realizado por WHITTAKER et al., (2002), verificaram uma tendência a maior taxa de prenhez em vacas tratadas com BE + CIDR quando inseminadas 53,4-57,5 h (57%) após retirada do CIDR em relação aquelas inseminadas 47-50 h (45%) ($p < 0,1$).

2.5. Gonadotrofina Coriônica equina (eCG)

A eCG foi descoberta quando pesquisadores observaram que a aplicação de soro de égua prenha estimulava o crescimento folicular em animais de laboratório (COLE & HART, 1930). Esse componente bioativo foi chamado de gonadotrofina sérica da égua prenha (PMSG, sigla em inglês). Mais tarde, foi descoberto que o PMSG era produzido pelas células coriônicas fetais que invadem o endométrio do útero formando os cálices endometriais, então o PMSG passou a ser chamado de gonadotrofina coriônica equina (eCG sigla em inglês) (ALLEM & MOON, 1972). A produção de eCG na égua prenha ocorre do 2 ao 5 mês atingindo o pico por volta dos 70 a 80 dias de prenhez, no entanto, este período sofre grande influência do animal (MURPHY & MARTINUK, 1991).

2.5.1. Características fisiológicas e estruturais da eCG

A análise proteica da eCG demonstrou que este hormônio é sintetizado e segregado como um heterodímero de cadeia α e β (MOORE & WARD, 1980). A estrutura primária da eCG β é idêntica ao LH β equino, sendo que ambos exibem uma extensão terminal carbóxilo de 30 aminoácidos, e sua calda é fortemente glicosilada (SUGINO et al., 1987) e são produtos de um único gene (SHERMAN et al., 1992), o que os diferenciam é a glicosilação diferencial. A cadeia LH β eqüino está repleta com oligossacarídeos sialilados e sulfatados, enquanto que na eCG β predominam os sialilados tornando a molécula mais glicosilada (MATSUI et al., 1991).

Vários experimentos demonstram que o eCG pode ser usado como indutor de ovulações múltiplas em vacas (GONZALEZ et al., 1994; BARUSELLI et al. 2008; MURPHY, 2012). No entanto, não foi elucidado por completo como ocorre o efeito de FSH. Acredita-se que há pequenas mutações no receptor de FSH resultando em desordem dos receptores, permitindo ao eCG interagir com os mesmos (MONTANELLI et al., 2004; VASSART & COSTAGLIOLA, 2011). Assim, a desordem da ligação ao receptor, em particular no receptor do FSH, é a base para a atividade dupla do eCG. Este efeito ainda é reforçado pela sua longa meia-vida (MURPHY & MARTINUK, 1991).

Uma característica importante do eCG é o tempo de ação em bovinos, e essa característica permite seu uso em protocolos de IATF e de superovulação. Menzer & Schams, (1979) demonstraram que a aplicação de 3000 UI em vacas ou 1500 UI de eCG em novilhas taurinas leva a um pico na concentração deste hormônio na corrente sanguínea com cerca de 12 – 24 horas após a aplicação e que ainda é possível detectar o mesmo 10 dias após a aplicação (Figura 2).

Figura 2 – Concentração de eCG na corrente sanguínea de vacas que receberam 3000 e 1500 UI de eCG

Adaptado de Menzer & Schams, 1979.

A base para a persistência do eCG na circulação sanguínea é a extensa glicosilação da molécula que compreende cerca de 45 % do seu peso molecular (PAPKOFF, 1974; MATTERI et al., 1987), sendo que 47 % da sua estrutura é composta por carboidratos. O principal carboidrato da molécula é a N-acil neuramina, ou ácido siálico, o que confere longa meia vida ao hormônio (MARTINUK et al., 1990). A remoção do ácido siálico da eCG após tratamento com neuroamidases reduziu claramente sua meia vida, sendo que 80 % do mesmo foi removido em 1 hora após a aplicação (MARTINUK et al., 1990). O padrão de glicosilação da eCG determina não só a sua persistência no soro, mas também a sua atividade biológica no tecido alvo (MARTINUK et al., 1990; MURPHY E MARTINUK, 1991; ULLOA-AGUIRRE et al., 1999).

2.5.2. Uso do eCG em reprodução de bovinos

O sucesso de um programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) depende de uma elevada taxa de ovulação durante um curto intervalo de tempo (SÁ FILHO et al., 2010). Portanto, o folículo dominante deve adquirir a capacidade de

ovulação, em resposta a um tratamento de indução da ovulação. Em bovinos, os folículos adquirem a capacidade de ovular quando atingem um diâmetro de cerca de 10 ou 12 milímetros (*Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente; SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008). Vacas sob estresse nutricional têm baixa liberação de GnRH e, conseqüentemente, baixa frequência de pulsos de LH, resultando em menores folículos dominantes e ondas foliculares sem ovulação ou com a ovulação de um folículo pequeno (ROCHE et al., 1992). Na maioria das vezes, estas são as principais causas de prolongado intervalo entre parto e concepção, o que causa queda na eficiência reprodutiva em bovinos de corte (YAVAS, 2000).

Ao ser administrada em vacas em anestro, o eCG cria condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em vacas que tenham comprometimento na liberação de gonadotrofinas. Seu uso tem apresentado efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade (anestro), em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses), em animais com condição corporal comprometida ($\leq 2,5$ na escala de 1 a 5; BARUSELLI et al., 2004a) e em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de progesterona ao final do tratamento de sincronização da ovulação (aumenta a taxa de ovulação; BARUSELLI et al., 2004b e taxa de prenhez; MARQUES et al., 2005).

Parece haver um consenso na literatura científica que o uso da eCG aumenta a taxa de prenhez, mas a literatura é bem clara que o uso da eCG só é eficiente em vacas que, por algum motivo, tem um folículo ovulatório pequeno (BARUSELLI et al., 2004; MARQUES et al.; 2005). Segundo esses autores o eCG é capaz de elevar a taxa de prenhez nos lotes que o controle obtém em torno de 30-40 % de taxa de prenhez, mas quando o controle promove resultados em torno de 60 % a eCG não é eficaz. No entanto, poucos trabalhos mostram se a antecipação da aplicação de eCG durante um protocolo de IATF pode melhorar os parâmetros reprodutivos.

REFERÊNCIAS

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.

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

BARROS, C. M. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE O CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1, São Paulo, 2000. **Anais...** São Paulo, 2000. p. 158-189.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.

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

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O.; RODRIGUES, C. A.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; REIS, E. L.; SÁ FILHO, M. F. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise retrospectiva). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32. p. 228, 2004. Trabalho apresentado a 18. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita, 2004a.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increases ovulation rate and plasmatc progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2004, Porto Seguro. , vol. 1, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: CBRA, 2004b. p. 117

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI J. O.; SALES J. N. S.; CREPALDI G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2008. p. 146-167.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F. S.; NASSER, L. F. T., RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. (2009). Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 67-74, 2009.

BERGFELD, E. D.; KOJIMA, N.; WEHRMAN, M. F.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITOK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentrations in cows is related of concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3/4, p. 257-265, 1995.

BIEHL, M. V.; PIRES, A. V.; 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 Nellore beef cows. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v.1, n.1, p.322, 2010. (Abstract).

BÓ, G. A., CUTAIA, L., BROGLIATTI, G. M., MEDINA, M., TRÍBULO, R., TRÍBULO, H. Programas de inseminacion artificial a tiempo fijo en ganado bovino utilizando progestágenos y estradiol. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 2001. p. 117-136.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1128, 1996.

BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, p. 843-851, 2008.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 208-215, 2010.

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.

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* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CHESTA, P.; CUTAIA, L.; BÓ, G. A. Efecto del tratamiento con un DIB por 7 u 8 días sobre los porcentajes de preñez en vaquillonas cruza índicas inseminadas a tiempo fijo. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., Huerta Grande, Córdoba, 2003. p. 387. (Abstract).

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; AONO, F.H.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 903-911, 2010.

COLE, H. H.; HART, G. H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effectin the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, v. 93 p. 57-68, 1930.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF.** 2009. 87 f. Dissertação (Mestre Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CUTAIA, L.; VENERANDA, G.; TRIBULO, R.; BARUSELLI, P. S.; BÓ, G. A. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba, Argentina. **Anales...** Córdoba: [s.n.], 2003. p.119-132.

DALTON, J. C.; SAACKE, R. G. Parâmetros da qualidade do sêmen para programas de sincronização. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 11, Uberlândia, 2007. **Anais...** Botucatu: CONAPEC Jr. UNESP, 2007.

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.

DUNCAN, G. W.; LESTER, S. C.; HENDRIX, J. W.; CLARK, J. J.; WEBSTER, H. D. Biological effects of melengestrol acetate. **Fertility and Sterility**. v. 15, p. 419-432. 1964.

GIMENES L. U.; SA FILHO M. F.; CARVALHO N. A.; TORRES-JUNIOR J. R.; SOUZA A. H.; MADUREIRA E. H. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852–858, 2008.

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

GORDON, I. Controlled breeding in cattle. Part 1. Hormone in the regulation of reproduction, oestrus, control, and set time artificial insemination. **Animal Breeding Abstracts**, v. 44, p. 265-275, 1976.

GREGORY, R. M. Métodos de sincronização de estros em bovinos. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO BOVINA SINCRONIZAÇÃO DE ESTROS EM BOVINOS, 1, Porto Alegre, RS. **Anais ...** Porto Alegre: Gráfica Jacuí, 2002. p. 18-24.

GUMEN, A.; WILTBANK, M. C. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1689-1695, 2002.

GUMEN, 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, p. 3184-3194, 2003.

HANSEL, W. Control of the ovarian cycle in cattle. In: LAMMING, G.E. & AMOROSO, E.C. (Ed.). **Reproduction in the female mammal**. London: Butterworths, 1967. p. 419-439.

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.

HUNTER, R. H. F. Causes for failure of fertilization in domestic species. In: ZAVY, M. T.; GEISERT, R. D. (Ed.) **Embryonic mortality in domestic species**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 1-22.

JÖCHLE, W.; ESPARZA, H.; GIMENEZ, T.; HIDALGO, M. A. Inhibition of corticoid-induced parturition by progesterone in cattle: Effect on delivery and calf viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, n. 2, p. 407-412, 1972.

KASIMANICKAM, R.; COLLINS, J. C.; WUENSCHHELL, J.; CURRIN, J. C.; HALL, J. B.; WHITTIER D. W. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, v. 66, p. 166-172, 2006.

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.

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

KOJIMA F. N.; BERGFELD E. G. M.; WEHRMAN M. E.; CUPP A. S.; FIKE K. E.; MARISCAL- AGUAYO D. V. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 187-211, 2003.

LAMOND, D. R. Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. **Animal Breeding**, v. 32, p. 269-285, 1969. (Abstract).

LONG, S.T.; YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice-used CIDR. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 80-82, 2009.

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.

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

MARQUES, M. O.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; FIGUEIREDO, T. B.; SORIA, G. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com PGF2a na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore. In: *Acta Scientiae Veterinariae*, Angra dos Reis/RJ. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 1, p. 287-287, 2005.

MARQUES, M. O.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; FIGUEIREDO, T. B.; SORIA, G. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com PGF2a na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 287-287, 2005. Suplemento 1. Trabalho apresentado a 19th Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting, Angra dos Reis, 2005. (Resumo)

MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2014.

MARTINUK, S. D.; BRISTOL, F.; MURPHY, B. D. Effects of the dam on equine chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 551-557, 1990.

MATSUI, T.; SUGINO, H.; MIURA, M.; BOUSFIELD, G. R.; WARD, D. N.; TITANI, K.; MIZUOCHI, T. Beta-subunits of equine chorionic gonadotropin and lutenizing hormone with an identical amino acid sequence have different asparagine-linked oligosaccharide chains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 174, p. 940-945, 1991.

MATTERI, R. L.; BALDWIN, D. M.; LASLEY, B. L.; PAPKOF, H. Biological and immunological properties of zebra pituitary gonadotropins: comparison with horse and donkey gonadotropins. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 1134-1141, 1987.

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, p. 179–189, 2009.

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

MONTANELLI, L.; VAN DURME, J. J.; SMITS, G.; BONOMI, M.; RODIEN, P.; DEVOR, E. J.; MOFFAT-WILSON, K.; PARDO, L.; VASSART, G.; COSTAGLIOLA, S. Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 2061-2073, 2004.

MOORE, W. T. JR, WARD, D. N. Pregnant mare serum gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 6923-6929, 1980.

MORAES, J. C. F. Controle da reprodução em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO BOVINA: SINCRONIZAÇÃO DE ESTROS EM BOVINOS, Porto Alegre, 2002. **Anais ...** Porto Alegre: Gráfica Jacuí, 2002. p. 32-40.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27 - 44, 1991.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, 2012.

NÚÑEZ-OLIVERA, R.; CASTRO, T.; GARCÍA-PINTOS, C.; BÓ G.; PIAGGIO, J.; MENCHACA, A. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111–116, 2014.

PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, p. 397-404, 1974.

PERES R. F. G.; JÚNIOR I. C.; SÁ FILHO O. G.; NOGUEIRA G. P.; VASCONCELOS J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-689, 2009.

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

PURSLEY, J. R., MEE, M. O., WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MARTINS, J.P. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 267–271, 2012.

ROCHE, J. F.; IRELAND, J.; MAWHINNEY, S. Control and induction of ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. v. 30, p. 211-222, 1981.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 371-378, 1992.

SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; PERES, A. A. P.; CARVALHO, C. A. B. ; CARVALHO, J. B.; ARAUJO, C. A. S. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of oestradiol valerate or benzoate on induction of a new follicular wave emergence in *Bos indicus* cows and heifers treated with norgestomet auricular implant. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 289, 2006.

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Emprego de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) previamente utilizado por 27 dias em protocolo de sincronização da ovulação em vacas nelore pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 615, 2008. (Resumo).

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JUNIOR, J. R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, E. P. L. A.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.182-187, 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.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTI, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial

insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

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.

SHERMAN, G. B.; WOLFE, M. W.; FARMERIE, T. A.; CLAY, C. M.; THREADGILL D. S.; SHARP, D. C.; NILSON, J. H. A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. **Molecular Endocrinology**, v. 6, p. 951-959, 1992.

SUGINO, H.; BOUSFIELD, G. R.; MOORE W. T. JR.; WARD D. N. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta-subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 8603-8609, 1987.

TORTORELLA, R. D.; FERREIRA, R.; SANTOS J. T.; ANDRADE NETO O. S.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B.; NEVES, J. P. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204-1209, 2013.

ULLOA-AGUIRRE, A.; TIMOSSI, C.; DAMIAN-MATSUMURA, P.; DIAS, J. A. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. **Endocrine**, v. 11, p. 205-215, 1999.

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. M. **Avaliação do protocolo de sincronização de ovulação “Ovsynch” e de fatores relacionados à associação entre produção de leite e taxa de concepção**. Jaboticabal, 128p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação da redução no tempo de tratamento com progesterona (9 vs. 7 dias) em protocolo de sincronização da ovulação em vacas nelore pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p. 614,

2008. Suplemento 2. Trabalho apresentado a XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology, Guarujá, 2008. (Resumo).

VASSART, G.; COSTAGLIOLA, S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v.7, p.362-372, 2011.

VIEIRA, R. J.; CHOW, L. A.; SOUSA, A. O. et al. Sincronização do ciclo estral em vacas mestiças pela administração do fator liberador de Gonadotrofina (GnRH) em associação com prostaglandina F2 alfa (PGF2 α). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 28, p. 215-220, 2004.

WEBEL, S. K. Control of the estrous cycle in cattle with a progesterone releasing intravaginal device. In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 8., 1976, Krakow. **Proceedings...** Krakow: Wroclawska Drukarnia Naukowa, 1976. v. 3, p. 521-523.

WHITTAKER, P. R.; COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. New or used CIDR-B devices and estradiol benzoate, with or without progesterone, for fixed-time AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 391, 2002. (Abstract).

WHITTIER, W. D.; KASIMANICKAM, R. K.; CURRIN, J. F.; SCHRAMM, H. H. VLCEK, M. Effect of timing of second prostaglandin F2 α administration in a 5-day, progesterone-based CO-Synch protocol on AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 74, p. 1002-1009, 2010.

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

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; GIORDANO, J. O.; NASCIMENTO, A. B.; VASCONCELOS, J. M.; PEREIRA, M. H. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal of Reproduction**, v. 9, p. 231-241, 2012.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 25–55, 2000.

YELICH, J. V. A vaginal insert (CIDR) to synchronize estrus and time-AI. In: FIELDS, M. J.; SANDS, R. S.; YELICH, J. V. (Ed.) **Factors affecting calf crop: biotechnology of reproduction**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 87-100.

3. Capítulo I - Comparação entre protocolos de IATF com 7 vs. 9 dias de permanência do CIDR em vacas Nelore.

3.1. INTRODUÇÃO

Existem atualmente vários tipos de tratamentos hormonais que permitem manipular o ciclo estral e a ovulação da fêmea bovina. A escolha do tratamento hormonal depende do custo e da aplicabilidade às condições de campo (LUCY et al. 2004). Tem-se utilizado diversos tratamentos à base de progesterona (P4) e/ou progestágenos associados a outros hormônios, com apresentações e métodos de aplicação distintos (HERNÁNDEZ et al. 2008). Um deles é o uso do dispositivo intravaginal de liberação controlada (CIDR®), que contém 1,9 g de progesterona liberada de maneira constante e relativamente uniforme, enquanto o dispositivo encontra-se inserido na fêmea (RATHBONE et al. 2002).

O tempo de permanência do CIDR em protocolos utilizados atualmente em vacas de corte no Brasil varia de 8 a 9 dias. No entanto, Bridges et al., (2008) verificou que a redução do tempo de CIDR aumenta a taxa de prenhez do protocolo de IATF em vacas Angus, e permite um maior potencial de crescimento folicular. Assim, alguns autores formularam a hipótese de que a diminuição do tempo de exposição à P4 pode aumentar a produção de estradiol pelo folículo ovulatório e consequentemente aumento na taxa de prenhez (VALDEZ et al., 2005; BRIDGES et al., 2008). Esse incremento pode ocorrer em virtude do potencial dos folículos jovens secretarem mais estradiol, quando comparados com folículos mais velhos, e também em virtude de um intervalo maior entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF (BURKE et al., 2001).

Diante dos pontos levantados acima, a redução do tempo de CIDR de 9 para 7 dias de permanência pode ser uma alternativa interessante para IATF pois têm a possibilidade de aumentar o intervalo entre a retirada do CIDR e a IATF, permitindo a esse folículo jovem um maior potencial de crescimento, além de vislumbrar o aumento do número de vezes que pode-se usar o dispositivo, diminuindo os custos com protocolo de IATF. Assim, a hipótese deste estudo foi avaliar se a redução do tempo de permanência do CIDR de 9 para 7 dias permite ao folículo um maior desenvolvimento, possibilitando que vacas Nelore submetidas à IATF com protocolo

de 7 dias apresente maior ou semelhante taxa de prenhez em relação ao de 9 dias. Os objetivos foram avaliar os efeitos da redução no tempo de permanência do CIDR de 9 para 7 dias sobre o diâmetro folicular no momento da IATF, taxa de detecção de estro, concentração de P4 10 dias após a IATF, taxa de ovulação e taxa de prenhez.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais e Local

O experimento foi realizado na Fazenda Cavalinho situada no Município de São Pedro - São Paulo. A fazenda pertence ao grupo Claritas Agronegócios Ltda. e tem como principal atividade a criação de bovinos de corte.

Utilizaram-se neste estudo 679 vacas lactantes entre 40-60 dias pós parto, escore de condição corporal $2,62 \pm 0,02$ (escala de 1 a 5), $10 \pm 3,2$ anos de idade, todas *Bos indicus* da raça Nelore. No início dos tratamentos apenas 12,4 % (84/674) das vacas estavam ciclando, sendo que destas, 6,5 % (44/84) pertenciam ao tratamento com tempo de permanência do CIDR de 7 dias e 5,9 % (40/84) do tratamento com 9 dias.

Os animais foram mantidos em sistema extensivo utilizando a *Brachiaria humidicola* como pastagem predominante. O fornecimento de água e mistura mineral foi *ad libitum*, por meio de bebedouros naturais e cochos cobertos, respectivamente.

3.2.2. Protocolos e manejos

As vacas foram submetidas à sincronização da ovulação com inserção do dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR®, Zoetis Saúde Animal) e aplicação via i.m. de 2,0 mg de BE (Estrogin®, Biofarm), sendo considerado dia zero (d0) do protocolo.

No protocolo 9d-CIDR, o dispositivo permaneceu nas vacas por 9 dias. Após a retirada do mesmo foi administrado via i.m. 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis Saúde Animal), 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis Saúde Animal) e 25 mg de PGF2 α (Lutalyse®, Dinoprost Trometamina, Zoetis Saúde Animal). Para permitir que a IATF fosse realizada no mesmo dia em ambos os tratamentos, no protocolo 9d-CIDR o CIDR foi colocado dois dias antes para que sua retirada e consequentemente a IATF ocorresse no mesmo dia do protocolo 7d-CIDR. As vacas desse tratamento foram marcadas com tinta no momento da inserção do CIDR e mantidas no mesmo lote que as vacas do tratamento 7d-CIDR. A inseminação foi realizada cerca de 48 horas após a retirada do CIDR (pela manhã) (Figura 3), utilizando sêmen convencional proveniente de cinco touros (3 da raça Nelore e 2 Angus).

No protocolo 7d-CIDR, o dispositivo permaneceu nas vacas por 7 dias. Após a retirada o manejo foi semelhante ao 9d-CIDR, porém, a inseminação foi realizada cerca de 55 horas (à tarde) após, devido ao maior intervalo entre a retirada do CIDR e o estro neste protocolo em relação ao de 9 dias (MARTINS et al., 2014) (Figura 3). Utilizou-se sêmen convencional proveniente de cinco touros (3 Nelore e 2 Angus).

Figura 3 - Modelo esquemático dos protocolos e manejos executados segundo cada tratamento.

BE: Benzoato de estradiol; P4: Progesterona; PGF: Prostaglandina; eCG: Gonadotrofina coriônica equina; ECP: Cipionato de estradiol; US: Ultrassonografia; Sg: Colheita de sangue.

No dia da retirada do CIDR foi colocado um adesivo (EstroTECT™), na base da cauda, para auxiliar na detecção do estro, com objetivo de detectar quais vacas aceitaram monta até o momento da IA.

Para avaliar o diâmetro folicular foi realizado exame ginecológico com auxílio de ultrassonografia utilizando o aparelho Mindray® DP-2200Vet com transdutor linear (7.5 Mhz). O exame ginecológico foi realizado no d0 para avaliar a presença ou ausência de CL e no momento da IATF para avaliar o diâmetro do folículo ovulatório (ØFO). Para analisar a taxa de ovulação foi realizada US 10 dias após a IATF em 30% das vacas de cada tratamento, juntamente com a posterior análise da concentração de P4. Posteriormente, 30 dias após a IATF, foi realizado um novo exame ginecológico para diagnóstico de prenhez.

3.2.3. Colheita e análise de amostras

Conforme demonstrado na Figura 3, foram colhidas amostras de sangue para determinação das concentrações séricas de P4 e confirmação da ovulação (10 dias após a IA). Essas amostras foram obtidas através de venopunção da veia coccígea utilizando tubos Vacutainer®. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 10 minutos, para separação do soro, que foi armazenado em tubos tipo Eppendorf®, identificados, congelados e mantidos em câmara fria a -18°C, para posterior análise.

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA) do Departamento de Zootecnia da ESALQ. A concentração sérica de P4 foi determinada através do método de quimioluminescência, com o auxílio de kits comerciais de IMMULITE® 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), com limite mínimo de 0,20 ng/mL e máximo de 20 ng/mL e sensibilidade de 0,001 ng/ml. O coeficiente de variação foi de 3,69% para o controle baixo e 1,70% para o controle alto de intra-ensaio. Vacas que apresentaram valores de P4 < 2,0 ng/ml 10 dias após a inseminação foram não entraram no cálculo da concentrações média de P4 em cada protocolo, sendo 19,4% (21/108) do tratamento 7d-CIDR e 11,4% (10/88) do 9d-CIDR por serem consideradas como animais que não ovularam ao protocolo.

3.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizado, sendo o lote incluso no modelo como bloco. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote SAS 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). As variáveis contínuas como diâmetro folicular na IATF e concentração sérica de P4 foram analisadas pelo PROC MIXED sendo que o ECC foi incluso no modelo como covariável para diâmetro folicular na IA. Foram testadas quanto a normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk, com retirada de “outliers” e transformação dos dados quando necessário. A retirada dos “outliers” foi feita com base na observação de dados que apresentaram valores extremos. No caso da variável diâmetro folicular, foram retiradas vacas com cistos, e aquelas que ovularam antes da IATF ou não foram sincronizadas. Além disso, os dados foram submetidos a homogeneidade das variâncias pelo Bartlett’s test. As médias foram ajustadas através do *lsmeans*. As variáveis binomiais como taxa de detecção de estro, ovulação e prenhez foram analisadas pelo PROC GLIMMIX e as médias foram obtidas através do PROC MEANS. Diferenças significativas foram consideradas com uma probabilidade de $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

As vacas tratadas com permanência de CIDR por 7 dias apresentaram menor ($p < 0,01$) folículo ovulatório ($11,46 \pm 0,60$ mm) em relação ao grupo 9d-CIDR ($12,26 \pm 0,60$ mm) no momento da IATF. Na análise do diâmetro folicular, observaram-se vacas com cistos (Folículo > 18 mm), sendo 0,8 % (3/360) do tratamento 7d-CIDR e 0,3 % (1/319) do 9d-CIDR, e vacas que provavelmente ovularam antes da IATF 3,3 % (12/360) e 2,5 % (8/319), respectivamente. Apesar da diferença no diâmetro folicular, a concentração sérica de P4 10 dias após a inseminação não foi afetada ($p = 0,21$) pelo tratamento 7d-CIDR ($5,27 \pm 0,30$) e 9d-CIDR ($5,62 \pm 0,30$ ng/ml); nem pela expressão de estro (com estro – $5,52 \pm 0,30$ e sem estro – $5,20 \pm 0,38$ ng/ml), respectivamente. Também não houve diferença na taxa de ovulação 80,5% (87/108) e 88,6% (78/88) ($p = 0,13$) e taxa de detecção de estro 72,2% (260/360) e 74,2%

(233/319) ($p = 0,60$) no grupo 7d-CIDR em relação ao grupo 9d-CIDR, respectivamente (Tabela 2).

A taxa de prenhez total não foi influenciada pelo tratamento, sendo que o grupo 7d-CIDR obteve 56,2% (195/347) e o grupo 9d-CIDR 54,2% (167/308) ($p = 0,49$). Nas vacas que não expressaram estro a taxa de prenhez foi de [43,1% (41/95) e 41,0% (32/78); $p = 0,78$], já nas que apresentaram comportamento de estro foi de [61,1% (154/252) e 59,5% (134/225); $p = 0,67$] para os grupos 7d-CIDR e 9d-CIDR, respectivamente (Tabela 2). O efeito de lote foi avaliado e observaram-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre eles sobre taxa de prenhez, no entanto, não houve interação ($p = 0,90$) do lote com o tratamento, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Taxa de prenhez de acordo com os lotes tratados com protocolo de 7 ou 9 dias de permanência do CIDR

Lotes tratados	Tratamentos ^a		Valor P
	7d-CIDR	9d-CIDR	
Lote 1 (%)	54 (27/50)	45 (21/47)	0,36
Lote 2 (%)	57 (23/40)	62 (23/37)	0,67
Lote 3 (%)	48 (28/58)	47 (26/55)	0,91
Lote 4 (%)	52 (55/105)	47 (32/68)	0,49
Lote 5 (%)	66 (62/94)	64 (65/101)	0,81

^a média (número observado/número total)

Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 ou 9 dias de dispositivo de P4 (CIDR)

Parâmetros	Tratamentos		Valor P
	7d-CIDR	9d-CIDR	
Diâmetro folicular na IA (mm) ^a	11,5 ± 0,60	12,3 ± 0,60	<0,01
Concentração sérica de P4 (ng/mL) ^{a*}	5,3 ± 0,30	5,6 ± 0,30	0,21
Taxa de ovulação (%) ^b	80,5 (87/108)	88,6 (78/88)	0,13
Taxa de detecção de estro (%) ^b	72,2 (260/360)	74,2 (233/319)	0,60
Taxa de prenhez sem estro (%) ^b	43,1 (41/95)	41,0 (32/78)	0,78
Taxa de prenhez com estro (%) ^b	61,1 (154/252)	59,5 (134/225)	0,67
Taxa de prenhez total (%) ^b	56,2 (195/347)	54,2 (167/308)	0,49

*Concentração sérica de progesterona 10 dias após a inseminação

^a média ± erro padrão da média

^b média (número observado/número total)

3.4. DISCUSSÃO

Considerando que no dia zero foi inserido o CIDR e administrado BE para sincronizar a onda folicular e o tempo para emergência de uma nova onda em vacas é por volta de 3 a 4 dias (BÓ et al., 1995; BÓ et al., 2003; MORENO et al. 2001). Dessa forma, no momento da retirada do CIDR os folículos do grupo 7d-CIDR estavam com 3 a 4 dias e no grupo 9d-CIDR 5 a 6 dias de idade. Somando-se ainda o período da retirada à inseminação, 55 horas para 7d-CIDR e 48 horas para 9d-CIDR, a idade do folículo foi de (5,3-6,3 dias) e (7-8 dias), respectivamente, no momento da IATF. Isso explica o menor tamanho do FO no protocolo 7d-CIDR. Um menor diâmetro folicular no protocolo com 7 dias de permanência em relação ao protocolo com 9 dias também foi observado em novilhas Nelore tratadas com CIDR previamente utilizado por 18 dias (MARTINS et al., 2014) e em vacas Nelore multíparas (VASCONCELOS & SÁ FILHO, 2008).

No entanto, o diâmetro folicular de $11,46 \pm 0,60$ mm (7d-CIDR) e $12,26 \pm 0,60$ mm (9d-CIDR) levou a uma diferença de 0,8 mm no FO entre os tratamentos e considerando o diâmetro folicular de 4 mm na emergência da onda (GINTHER et al., 2001), estima-se através da idade do folículo ovulatório que o crescimento diário médio foi de 1,29 mm para o grupo 7d-CIDR e 1,10 mm em 9d-CIDR. Portanto, pode-se inferir que o tratamento 7d-CIDR permitiu um maior potencial de desenvolvimento do FO após a retirada do dispositivo.

Apesar do menor tamanho do FO, a concentração de P4 10 dias após a IA foi semelhante entre os protocolos, outro fato que comprova a capacidade esteroidogênica do FO no protocolo de 7d-CIDR. Isso porque a concentração de P4 pós IA é importante para o crescimento embrionário (CARTER et al., 2008) e por conseguinte secreção de interferon-tau (MANN, et al., 1999), prevenindo perdas por falha no reconhecimento materno da gestação aumentando a taxa de prenhez e sobrevivência embrionária (BELTMAN et al., 2009).

Outro fator que também está ligado a eficiência do protocolo de IATF é a taxa de ovulação. Neste estudo foram encontradas altas taxas de ovulação (> 80%) em ambos os grupos e não houve diferença entre eles. Em vacas de corte tratadas com protocolo a base de BE + P4 observou-se algumas variações 80 - 90% (MENEGETTI et al., 2009) a 70 - 85% (SALES et al., 2015) na taxa de ovulação. Em novilhas púberes

foram encontradas taxas de ovulação variando de 84 - 94% (PERES et al., 2009). Apesar dos resultados variarem de 10 a 15% nos estudos acima, esse tipo de protocolo apresenta alta taxa de ovulação e em nenhum dos trabalhos acima apresentaram diferença na fertilidade, independentemente do número de animais que ovularam ao protocolo.

Estudos anteriores mostraram que vacas submetidas a protocolo de IATF, quando apresentam estro tem maior probabilidade de se tornarem prenhes (SÁ FILHO et al., 2011). Da mesma forma, Perry et al. (2007), afirma que vacas que exibem estro têm maiores concentrações de estradiol durante o proestro, isso pode explicar o efeito positivo do estro sobre a concepção. Nesse estudo, a taxa de detecção de estro não diferiu entre os tratamentos 7d-CIDR 72% (260/360) e 9d-CIDR 74% (233/319), valores semelhantes aos encontrados por Martins et al., (2014) 67 e 71%, respectivamente, em novilhas Nelore púberes através de observação visual do estro. Outro ponto que mostra a capacidade esteroidogênica do FO em protocolo de 7d-CIDR.

A redução do tempo de permanência do CIDR de 9 para 7 dias não afetou a taxa de prenhez. Resultado semelhante ao encontrado por Vasconcelos & Sá Filho (2008) em vacas Nelore multíparas submetidas à IATF, com taxa de concepção não diferindo entre os tratamentos com 7 ou 9 dias de permanência do dispositivo. Já em estudo com novilhas Nelore submetidas a IA após detecção visual do estro, a redução no tempo de permanência do dispositivo resultou em menor taxa de concepção e prenhez após sincronização do estro e ovulação com 7 dias de CIDR em relação ao protocolo com 9 dias (MARTINS et al., 2014). Provavelmente, o fato desses autores não terem inseminado as novilhas em tempo fixo pode ter influenciado os índices reprodutivos no protocolo de 7 dias em relação ao protocolo de 9 dias de CIDR.

3.5. CONCLUSÃO

A redução em dois dias do tempo de permanência do dispositivo em protocolo utilizando BE + CIDR não afetou negativamente as variáveis estudadas. O folículo ovulatório apresentou um menor diâmetro no momento da IATF no protocolo de 7 dias, porém, o folículo neste protocolo é mais jovem em relação ao do protocolo de 9 dias.

Isso implica que o protocolo de 7d-CIDR é semelhante ao protocolo de 9d-CIDR e abre a possibilidade de aumentar o número de vezes que o CIDR pode ser utilizado, reduzindo assim os custos com protocolos de IATF.

REFERÊNCIAS

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increases ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: XIV **International Congress on Animal Reproduction**, 14., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...**Porto Seguro: [s.n], 2004. v. 1, p. 117.

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.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

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

BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, 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 oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**. v. 66, 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.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 638-647, 2001.

HERNÁNDEZ, C. W. S.; MENDOZA, J. H.; HIDALGO, C. G.; GODOY, A. V.; AVILA, H. R. V.; GARCÍA, S. R. Reuse of a progesterone releasing device (CIDR-B) for

estrus synchronization within an embryo transfer program in bovines. **Técnica Pecuária En México**, v. 46, n. 2, p. 119-135, 2008.

LUCY, M.C.; McDOUGALL, S.; NATION, S.P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.495-512, 2004.

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.

MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology** v. 81, p. 446-453, 2014.

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, p. 179-189, 2009.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devises, estradiol benzoato and progesterone. **Theriogenology**, v.55, p. 408, 2001. (Abstract).

PERES R.F.G.; JÚNIOR I.C.; SÁ FILHO O.G.; NOGUEIRA G.P.; VASCONCELOS J.L.M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.72, p.681-689, 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.

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

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of Controlled Release**, v.85, p.105-115, 2002.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JUNIOR, J. R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, E. P. L. A.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.182-187, 2010.

SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p. 455-463, 2011.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTI, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

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. M.; SÁ FILHO, O. G. Avaliação da redução no tempo de tratamento com progesterona (9 vs. 7 dias) em protocolo de sincronização da ovulação em vacas nelore pós-parto. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, p. 614, 2008. Suplemento 2. Trabalho apresentado a XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology, Guarujá, 2008. (Resumo).

4. Capítulo II: Efeito da reutilização do CIDR em protocolos de IATF sobre desempenho reprodutivo.

4.1. INTRODUÇÃO

Protocolos a base de BE + P4 têm sido amplamente utilizados nos programas de IATF pelo Brasil. A reutilização dos dispositivos de P4 é uma prática comum e se aplicada corretamente pode reduzir os custos do protocolo sem afetar a eficiência reprodutiva dos animais tratados.

De acordo com as recomendações do fabricante, o CIDR não deve ser reutilizado. No entanto sua reutilização em vacas em anestro, por até 4 vezes, não alterou o desenvolvimento folicular, taxa de ovulação e taxa de prenhez em vacas no período pós-parto (SÁ FILHO E VASCONCELOS, 2008; MENEGHETTI et al. 2009) e ainda aumentou o diâmetro folicular e taxa de prenhez em novilhas pré-púberes, submetidas a protocolo de indução da puberdade com posterior IA com observação de estro (CLARO JUNIOR et al., 2010).

Vários autores têm mostrado que reduzindo as concentrações circulantes de P4 durante protocolos de sincronização da ovulação, pode haver melhorias na fertilidade (BRIDGES et al., 2008; BRIDGES et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2011). Em novilhas púberes tratados com CIDR previamente utilizado por 18 dias, foram observadas menores concentrações séricas de P4 (DIAS et al., 2009; PERES et al., 2009) e maiores taxas de prenhez (DIAS et al., 2009) em comparação com protocolo utilizando CIDR novo. Esse efeito foi bem evidente em novilhas Zebuínas (CARVALHO 2008), no entanto, os trabalhos mostram que o uso do CIDR reutilizável em vacas Nelore lactantes não altera os resultados de prenhez (MENEGUETTI et al., 2009).

Esses estudos anteriores mostram que em animais com ou sem CL no início do protocolo, o uso de CIDR reutilizado por até quatro vezes não afetou negativamente a fertilidade em protocolos utilizando P4+BE (SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2008; MENEGUETTI et al., 2009). Para comprovar a possibilidade de reutilização do CIDR em protocolo com 7 dias de permanência do mesmo, realizou-se outro estudo trabalhando com o mesmo protocolo e reutilizando o CIDR por até 5 vezes em vacas

e novilhas púberes, além de utilizar o sexto uso para sincronização de novilhas. A hipótese deste trabalho é que a redução da concentração de P4 durante o protocolo de sincronização do estro e ovulação não interfere nos índices reprodutivos. O objetivo foi avaliar os efeitos dessa reutilização sobre características reprodutivas como diâmetro folicular, concentração de P4 no dia da retirada do dispositivo, além das taxas de detecção de estro e prenhez desses animais.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Animais e Local

O experimento foi realizado na Fazenda Cavalinho situada no Município de São Pedro - São Paulo. A fazenda pertence ao grupo Claritas Agronegócios Ltda. e tem como principal atividade a criação de bovinos de corte.

Utilizaram-se neste estudo 841 fêmeas, sendo 749 vacas lactantes 40-60 dias pós parto com ECC ($2,81 \pm 0,01$), $11 \pm 3,2$ anos de idade e 92 novilhas púberes com peso corporal ($320 \pm 2,1$ kg), ECC ($2,86 \pm 0,01$) e $25,5 \pm 1,4$ meses de idade, todas *Bos indicus* da raça Nelore. No início do experimento apenas 12,5 % (94/749) das vacas apresentavam-se com CL.

Os animais foram mantidos em sistema extensivo utilizando a *Brachiaria humidicola* como pastagem predominante. O fornecimento de água e mistura mineral foi *ad libitum*, por meio de bebedouros naturais e cochos cobertos, respectivamente.

4.2.2. Protocolos e manejos

As fêmeas submetidas à sincronização da ovulação receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR®, Zoetis Saúde Animal) e aplicação via i.m. de 2,0 mg de BE (Benzoato HC, Hertape Calier), sendo considerado este o dia zero (d0) do protocolo. Utilizaram-se nesse protocolo, CIDR novo (CIDR1) e previamente

usado por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4), 28 (CIDR5). Sendo que todos os lotes receberem CIDR de ambos os usos no dia 0. No entanto, o número de animais em cada tratamento não foi semelhante devido a disponibilidade de dispositivos usados no momento da inserção. Nas novilhas, compararam-se CIDRs previamente utilizados por 21 (CIDR4) e 35 (CIDR6) dias, pois a literatura descreve que a P4 elevada durante o protocolo de sincronização nessa categoria pode ser prejudicial ao desempenho reprodutivo.

O dispositivo permaneceu por 7 dias e após ser retirado foi administrado por via i.m. 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis Saúde Animal), 0,6 mg de cipionato de estradiol (Cipionato HC, Hertape Calier) e 150 µg de cloprostenol (Veteglan® Luteolítico, Hertape Calier) em ambos os tratamentos (Figura 4).

Figura 4 - Modelo esquemático dos protocolos e manejos executados

BE: Benzoato de estradiol; CIDR: Progesterona; eCG: Gonadotrofina coriônica equina; ECP: Cipionato de estradiol; US: Ultrassonografia; Sg: Colheita de sangue.

Todos os dispositivos reutilizados foram lavados em água corrente e secos à sombra em temperatura ambiente para o próximo uso. Foram então identificados quanto ao número de usos e armazenados. No momento da inserção dos dispositivos, estes foram imersos em solução a 0,5 % (5 mL/L) contendo água e solução desinfetante (CB-30 T.A, Ouro Fino) que auxilia na limpeza e desinfecção dos mesmos antes de serem introduzidos no animal.

No dia da retirada do CIDR foi colocado um adesivo (Estroprotect™), na base da cauda, que auxilia na detecção do estro, com objetivo de detectar quais vacas aceitaram monta até o momento da IA.

Para avaliar os diâmetros foliculares foi realizado exame ginecológico com auxílio de ultrassonografia utilizando o aparelho Mindray® DP-2200Vet com transdutor linear (7,5 MHz). O exame ginecológico foi realizado no d0 para avaliar a presença ou

ausência de corpo lúteo (CL) no início do protocolo, no dia da retirada do CIDR para avaliar o diâmetro do maior folículo ($\emptyset$ FD) e no momento da IATF para avaliar o diâmetro do folículo ovulatório ($\emptyset$ FO). A partir dessas mensurações foi calculado o ritmo de crescimento folicular no período de proestro. Vacas que apresentavam folículo > 8 mm no dia da retirada do dispositivo e o mesmo não foi observado no momento da IATF, 2,3 % (7/298) foram consideradas como ovuladas e retiradas do cálculo de crescimento folicular. Destas vacas, duas pertenciam ao tratamento com CIDR1, duas do CIDR4 e três do CIDR5. Posteriormente, 30 dias após a IA, foi realizado um novo exame para diagnóstico de prenhez.

A inseminação ocorreu por volta de 55 horas após a retirada do CIDR. Para isso foi utilizado sêmen convencional proveniente de 7 touros, sendo 5 da raça Angus e 2 da raça Nelore.

4.2.3. Colheita e análise de amostras

Foram colhidas amostras de sangue para determinação das concentrações séricas de P4 no dia da retirada do dispositivo. Essas amostras foram obtidas através de venopunção da veia coccígea utilizando tubos Vacutainer® com gel separador de coágulo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 10 minutos, para separação do soro, que foi armazenado em tubos tipo Eppendorf®, identificados, congelados e armazenados em câmara fria a -18°C, para posterior análise.

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). A concentração sérica de P4 foi determinada através do método de quimioluminescência, com o auxílio de kits comerciais de IMMULITE® 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), com limite mínimo de 0,02 ng/mL e máximo de 20 ng/mL e sensibilidade de 0,001 ng/ml. O coeficiente de variação foi de 3,69 % para o controle baixo e 1,70 % para o controle alto de intra-ensaio. Vacas com CL no dia da retirada do CIDR [9,7 % (22/226)] foram retiradas da análise, sendo do tratamento com CIDR1 (7), CIDR2 (3), CIDR3 (6), CIDR4 (4) e CIDR5 (2).

4.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos nas vacas e dois nas novilhas. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote SAS 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). As variáveis contínuas como diâmetro folicular no dia da retirada do dispositivo, diâmetro folicular no momento da IA, taxa de crescimento folicular e concentração sérica de P4 no d7 foram analisadas pelo PROC MIXED sendo o ECC incluso no modelo como covariável para algumas variáveis quando teve efeito significativo sobre as mesmas e não apresentou interação com o tratamento. Além disso, também foi avaliado o efeito do lote sobre o tratamento e quando houve efeito avaliaram-se se havia interação do lote com o tratamento. As variáveis foram testadas quanto a normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk, com retirada de “outliers” e transformação dos dados quando necessário. A retirada dos “outliers” foi feita de acordo com o resíduo estudentizado > 3 ou < -3 . Para a variável diâmetro folicular, foram retiradas vacas com cistos (folículo > 18 mm de diâmetro), e aquelas que ovularam antes da IATF (folículo < 6 mm de diâmetro). Além disso, foram submetidos a homogeneidade das variâncias pelo Bartlett's test. As médias foram ajustadas através do *lsmeans* e comparadas por teste de médias utilizando o Tukey ajustado, exceto nas novilhas por ser apenas dois tratamentos. As variáveis binomiais como taxa de detecção de estro e prenhez foram analisadas pelo PROC GLIMMIX e as médias foram obtidas através do PROC MEANS e comparadas por teste de médias por Tukey ajustado. Para a variável taxa de prenhez foram testados efeito de inseminador e de touro (sêmen) e estes foram incluídos no modelo quando significativos. Diferenças significativas foram consideradas com uma probabilidade de $p < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

O diâmetro do FD ($\emptyset$ FD) no dia da retirada do dispositivo (d7) nas vacas diferiu ($p = 0,01$) entre os grupos tratados, sendo que no grupo tratado com dispositivo novo (CIDR1) foi menor quando comparado ao CIDR4 e CIDR5. Na US realizada no

momento da IA, verificou-se que o ØFO também apresentou diferença ($p < 0,01$) entre os grupos, no entanto, essa diferença não acompanhou a mesma tendência de quando se mensurou o ØFD. Não houve diferença ($p = 0,24$) na taxa de crescimento folicular entre os grupos (Tabela 3) e a porcentagem de vacas que ovularam antes da inseminação foi de 3,8 % (folículo < 6 mm), sendo que não houve influência do número de usos sobre a ovulação antecipada. Apenas 4 vacas apresentaram cisto (folículo > 18 mm), sendo uma do tratamento CIDR2, duas do CIDR4 e uma do CIDR5, estas também foram retiradas da análise de diâmetro folicular assim como as que ovularam antes da IATF. Ainda, a reutilização do CIDR não contribuiu para que houvesse um maior número de perdas, como pode ser verificado na Figura 5.

A concentração sérica de P4 no dia da retirada do dispositivo foi menor ($p < 0,01$) no CIDR5 em comparação ao CIDR1, CIDR2 e CIDR3. No entanto, todas as médias ficaram acima de 1,5 ng/mL. Apenas 5,3% (12/226) das vacas nas quais foi avaliada a concentração de P4 apresentaram valores < 1 ng/ mL. Destas vacas sete eram do tratamento CIDR5 e cinco do CIDR4, no entanto, apenas uma dessas vacas ovulou antes da IATF.

A taxa de detecção de estro foi menor no grupo CIDR5 quando comparado aos outros grupos ($p < 0,01$). Quando se compararam vacas detectadas em estro com as que não apresentaram estro, não houve influência do número de usos do CIDR sobre a taxa de prenhez em vacas sem estro ($p = 0,12$) ou naquelas com estro ($p = 0,77$). Além disso, também não houve diferença na taxa de prenhez total de acordo com o tratamento ($p = 0,29$). Houve efeito ($p < 0,01$) do lote sobre a taxa de prenhez, no entanto, não houve interação ($p = 0,96$) do lote com o tratamento.

Outro fator observado neste estudo foi a diferença de fertilidade entre o sêmen dos sete touros utilizados. Este fator influenciou a taxa de prenhez ($p < 0,01$) como pode ser observado na Figura 6.

Figura 5 – Porcentagem de perdas do CIDR de acordo com o número de usos, CIDR novo (CIDR1) e reutilizados por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4) e 28 (CIDR5) dias

Figura 6 – Taxa de prenhez na IATF de acordo com o sêmen de cada touro

^{a,b} médias com letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,01$).

Tabela 3 - Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias com uso de CIDRs novos (CIDR1) e reutilizados por 7 (CIDR2), 14 (CIDR3), 21 (CIDR4) e 28 (CIDR5)

Parâmetros	Tratamentos					Valor P
	CIDR1	CIDR2	CIDR3	CIDR4	CIDR5	
Diâmetro folicular no d7 (mm)	8,70 ± 0,21 ^b	9,26 ± 0,14 ^{ab}	9,15 ± 0,18 ^{ab}	9,43 ± 0,17 ^a	9,84 ± 0,27 ^a	0,01
Diâmetro folicular na IATF (mm)	11,60 ± 0,19 ^{ab}	11,81 ± 0,13 ^a	11,08 ± 0,21 ^b	12,09 ± 0,15 ^a	11,79 ± 0,23 ^{ab}	<0,01
Ritmo de crescimento folicular (mm/dia)*	1,35 ± 0,07	1,30 ± 0,05	1,11 ± 0,08	1,32 ± 0,06	1,23 ± 0,10	0,24
Concentração sérica de P4 no d7 (ng/mL)	2,37 ± 0,11 ^a	2,30 ± 0,10 ^a	2,11 ± 0,14 ^{ab}	1,95 ± 0,10 ^{bc}	1,63 ± 0,13 ^c	<0,01
Taxa de detecção de estro (%)	80,2 ^a (73/91)	77,6 ^a (146/188)	72,7 ^a (141/194)	77,4 ^a (103/133)	54,4 ^b (37/68)	<0,01
Taxa de prenhez de vacas sem estro (%)	16,6 (3/18)	17,5 (7/40)	25,0 (13/52)	46,1 (12/26)	35,5 (11/31)	0,12
Taxa de prenhez de vacas com estro (%)	50,7 (37/73)	51,0 (74/145)	45,3 (63/139)	52,5 (53/101)	58,3 (21/36)	0,77
Taxa de prenhez total (%)	44,0 (40/91)	42,3 (97/229)	39,8 (76/191)	49,1 (84/171)	47,7 (32/67)	0,29

* ritmo de crescimento folicular calculado a partir do diâmetro folicular no momento da IATF menos o diâmetro folicular no momento da retirada do CIDR

^{a,b,c} letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05).

O número de usos do CIDR não influenciou o diâmetro folicular no dia 7 (retirada do dispositivo), nem no momento da IATF nas novilhas púberes tratadas com CIDR reutilizado por 21 dias (CIDR4) ou 35 dias (CIDR6). Também não houve diferença na taxa de detecção de estro e taxa de prenhez entre os grupos tratados (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros reprodutivos de novilhas Nelore púberes submetidas a protocolo com 7 dias de permanência de CIDRs reutilizados por 21 (CIDR4) e 35 (CIDR6) dias

Parâmetros	Tratamentos		Valor P
	CIDR4	CIDR6	
Diâmetro folicular na retirada do CIDR (mm)	7,43 ± 0,37	7,55 ± 0,41	0,83
Diâmetro folicular na IATF (mm)	10,22 ± 0,25	9,83 ± 0,35	0,37
Taxa de detecção de estro (%)	88,0 (51/58)	94,1 (32/34)	0,37
Taxa de prenhez (%)	42,1 (24/58)	47,0 (16/34)	0,56

4.4. DISCUSSÃO

O protocolo com CIDR previamente utilizado por 21 (CIDR4) ou 28 (CIDR5) dias permitiu um maior crescimento do folículo dominante em relação ao protocolo utilizando CIDR novo. Isso indica que há um maior potencial de desenvolvimento folicular durante tratamento com CIDR reutilizado em protocolo de IATF em vacas Nelore. Altas concentrações plasmáticas de progesterona durante o desenvolvimento folicular podem influenciar negativamente o crescimento folicular, diminuindo a resposta ao protocolo de sincronização da ovulação (VILELA et al., 2003; CARVALHO et al., 2008; PERES et al., 2009), isso ocorre devido redução na frequência de liberação de hormônio luteinizante (LH) (BERGFELD et al., 1995; BURKE et al., 1996). Isso indica que vacas com baixas concentrações circulantes de P4 (1-2 ng / ml) apresentam maior diâmetro folicular e crescimento mais rápido em relação a vacas com altas concentrações de P4 (5-6 ng / ml) (CUPP et al., 1993). Em novilhas Nelore ovariectomizadas verificou-se concentrações médias de P4 durante tratamento com CIDR novo (3,8 ± 0,2 ng/mL), previamente usado por 8 (2,3 ± 0,1 ng/mL) e 16 (2,0 ± 0,1 ng/mL) dias (SALES et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, sendo que o CIDR4 e CIDR5 apresentaram concentração de P4 < 2

ng/mL no dia da retirada do CIDR, o que possivelmente colaborou para um maior desenvolvimento folicular em relação ao CIDR novo. Diante disso, também pode-se afirmar que a concentração de P4 durante o tratamento provavelmente foi superior ao valor encontrado 7 dias após, pois a mesma declina gradualmente até o final do período de tratamento (LONG et al., 2009).

Dada a importância do diâmetro do folículo ovulatório para obtenção de maior taxa de ovulação e de prenhez (BÓ et al, 2007; PERRY et al, 2007; SÁ FILHO et al., 2010), foi realizada ultrassonografia no momento da IA para mensuração do folículo ovulatório. No entanto, a diferença entre os grupos tratados não seguiu a mesma tendência que a mensuração no dia da retirada do CIDR. Sendo que os tratamentos com CIDRs reutilizados por mais vezes não apresentaram folículos ovulatórios maiores em relação aos dispositivos novos ou previamente utilizado por 7 ou 14 dias. Provavelmente o uso do eCG no dia da retirada no CIDR para estimular o crescimento folicular durante o proestro (SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2012), compensou o menor diâmetro observado no CIDR1 no dia da retirada do mesmo. Isso também pode ter sido influenciado pelo maior intervalo entre a retirada do CIDR e a IATF no protocolo de 7 dias em relação aos protocolos de 8 ou 9 dias de CIDR.

A taxa de detecção de estro tem sido um parâmetro bastante avaliado quando se trabalha experimentos avaliando protocolos de IATF. Protocolos a base BE + CIDR com utilização de dispositivo reutilizado não apresentaram diferença nas taxas de detecção de estro, 64% (112/175) para o CIDR novo e 67% (112/166) para CIDR previamente utilizado por 18 dias (MARTINS et al., 2014). Estes resultados corroboram aqueles encontrados no presente estudo, exceto pelo CIDR5 que apresentou menor taxa de detecção de estro (54%) nas vacas em relação aos demais. No entanto, o mesmo não foi observado nas novilhas quando se utilizou o sexto uso do CIDR (94%) em relação ao quarto (88%), provavelmente devido a maior sensibilidade dessa categoria à P4. Geralmente nos estudos com IATF não se avalia taxa de detecção de estro, portanto, não há na literatura estudos com uso do CIDR por mais de 3 vezes com tal avaliação. É necessário que se façam outros estudos para que confirme se o quinto uso do dispositivo realmente reduz a porcentagem de vacas apresentando estro na IATF, como foi observado neste estudo.

Apesar de não haver influência do número de usos do CIDR sobre a taxa de prenhez, a mesma foi baixa em relação a outros estudos utilizando CIDR usado em protocolo de IATF. Isso ocorreu devido a variação na fertilidade do sêmen, como pode

ser visto na (Figura 6). O sêmen dos touros considerados com baixa fertilidade foram analisados por microscopia eletrônica quanto a motilidade progressiva ao descongelamento e se encontravam dentro dos padrões mínimos aceitáveis para IATF de 30% (CBRA, 1998). No entanto, a taxa de prenhez das fêmeas inseminadas com esse sêmen não apresentou valores semelhantes de fertilidade em relação ao sêmen dos outros touros, variando cerca de até 30 pontos percentuais entre os touros de melhor e pior fertilidade. Isso também foi observado por Fullenwilder et al., (2001) avaliando a utilização de sêmen proveniente de 10 touros em protocolo de IATF encontraram taxas de prenhez variando de 25 a 61%. Isso mostra o grande impacto da fertilidade do sêmen sobre a taxa de prenhez na IATF.

Principalmente em novilhas, a utilização de implantes intravaginais reutilizados tem sido indicada como estratégia para melhorar a eficiência dos protocolos. Nesse estudo os dispositivos previamente utilizados por 35 (CIDR6) dias não diferiu para os parâmetros analisados como diâmetro folicular, taxa de detecção de estro e taxa de prenhez em relação ao CIDR4. Em novilhas zebuínas a alta concentração de P4 pode prejudicar o desenvolvimento folicular, provavelmente devido a um metabolismo hormonal mais lento quando comparado a taurinas (CARVALHO et al., 2008). Os resultados encontrados neste estudo indicam que provavelmente esse metabolismo lento contribuiu para que o CIDR pudesse ser utilizado por até 6 vezes sem prejuízo aos índices reprodutivos.

4.5. CONCLUSÃO

A utilização do CIDR por até 35 dias em vacas e 42 dias em novilhas Nelore submetidas a protocolo de sincronização com 7 dias de permanência do dispositivo não afetou a taxa de prenhez. A concentração de P4 no dia da retirada do CIDR foi reduzida ao reutilizar o CIDR por 4 ou 5 vezes em vacas, porém se manteve acima de 1,5 ng/ml, quantidade suficiente para sincronização do estro e ovulação. Esses resultados implicam que o uso do protocolo de 7d-CIDR+BE viabiliza o uso do CIDR por até 6 vezes, reduzindo assim o custo com o protocolo de IATF.

REFERÊNCIAS

BERGFELD, E. D.; KOJIMA, N.; WEHRMAN, M. F.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOCK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentrations in cows is related of concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3-4, p. 257-265, 1995.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. In: JUENGEL, J. L.; MURRAY, J. F.; SMITH, M. F. (Ed.). **Reproduction in domestic ruminants VI**. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p. 223-236.

BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, p. 843-851, 2008.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science** v. 117, p. 208-215, 2010.

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 13-28, 1996.

CARVALHO, J. B.; CARVALHO, N. A.; 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.

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; AONO, F. H. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, v.74, n.2, p. 903-911, 2010.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 .ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p. 24.

CUPP, A.; GARCIA-WINDER, M.; ZAMUDIO, A.; MARISCAL, V.; WEHRMAN, M.; KOJIMA, N. Concentration of progesterone (P4) in circulation has differential effect on biochemical characteristics of dominant follicles in cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 211, 1993.

DIAS, C. C.; WECHSLER, F. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2a treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2009.

FULLENWIDER, J.; KEMPFER, R.; BARTHLE C.; LEMASTER W.; YELICH J. Use of Intravaginal Progesterone-Releasing Device (CIDR) for Timed Artificial Insemination (AI) in crossbred cattle of Bos indicus breeding. **Beef Cattle Report**, 2001. p. 36-40.

LONG, S.T.; YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice-used CIDR. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 80-82, 2009.

MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2014.

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, p.179-189, 2009.

PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-689, 2009.

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

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Emprego de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) previamente utilizado por 27 dias em protocolo de sincronização da ovulação em vacas nelore pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**,

v.36, p. 614, 2008. Suplemento 2. Trabalho apresentado a XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology, Guarujá, 2008. (Resumo).

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; 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, p. 23-30, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p. 455-63, 2011.

SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; DE FARIA, M.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 427-435, 2011.

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, p. 510–516, 2012.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTI, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

VILELA E. E., VASCONCELOS J. L. M., SANTOS R. M., PEREZ G. C., LOSI T. C.; MARQUEZI G. H. L. Efeito da duração do implante de progesterona e da remoção do bezerro no diâmetro folicular em vacas Nelore pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.3, p. 421-423, 2003.

5. Capítulo III: Efeito da antecipação da aplicação do eCG no protocolo de 7 dias de CIDR

5.1. INTRODUÇÃO

O eCG é um hormônio que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (STEWART E ALLEN, 1981). No início da gestação da égua ele causa ovulação ou luteinização de folículos durante a gestação, com consequente aumento da progesterona circulante (revisado por MURPHY E MARTINUK, 1991). No entanto, é notório em vários experimentos a ação do eCG como FSH em outras espécies. A base fisiológica para esse evento ainda não foi completamente entendida, mas há várias referências mostrando que o eCG tem a capacidade de estimular o crescimento final do folículo ovulatório (provável função LH) e também quebrar a dominância e induzir ovulações múltiplas (provável função FSH), desenvolvendo estes eventos em fêmeas não equídeas, como por exemplo as vacas (MURPHY, 2012).

Quando utilizado em protocolos de IATF o eCG ocasiona maior crescimento do folículo ovulatório (SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2012) e maior produção de estrógeno pelas células da granulosa do folículo (BARUSELLI et al., 2004b), além de incrementar a produção de P4 após a IA (PERES et al., 2009; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Seu uso tem apresentado efeito positivo em vacas em condição de anestro, no período pós parto inferior a 2 meses e naquelas com condição corporal comprometida (CUTAIA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004a; SMALL et al., 2009). Em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de P4 ao final do protocolo, a eCG aumenta a taxa de ovulação (BARUSELLI et al., 2004b; SÁ FILHO et al., 2010; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014) e a taxa de prenhez (MARQUES et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi procurar incrementar ainda mais o crescimento folicular através da antecipação da aplicação da eCG em dois dias em relação a retirada do dispositivo de P4, consequentemente o CL oriundo dessa ovulação também seria maior. Diante da importância do tamanho do folículo e sua capacidade esteroidogênica dando origem ao CL liberando P4 para manter a gestação, o aumento

no tamanho do mesmo poderia aumentar as taxas de prenhez em vacas tratadas com eCG no dia 5 do protocolo de IATF com 7 dias de dispositivo de P4.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Animais e Local

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

Vacas Nelore com 40-60 dias pós parto e novilhas púberes foram submetidas ao protocolo de 7 dias de dispositivo de progesterona (P4) com aplicação de eCG no dia 5, ou seja, dois dias antes da retirada do dispositivo. Utilizaram-se neste estudo 863 fêmeas, sendo 681 vacas lactantes 40-60 dias pós parto e 182 novilhas púberes, todas *Bos indicus* da raça Nelore. No início do experimento esses animais apresentavam peso corporal (PC) $421 \pm 2,0$ para vacas e $361 \pm 2,1$ para novilhas; escore de condição corporal (ECC) $2,74 \pm 0,01$ e $2,98 \pm 0,01$ (escala de 1 a 5), respectivamente. A idade das novilhas no início do experimento foi de $26 \pm 0,06$ meses. Além disso, foi avaliada a presença ou ausência de CL nas vacas, sendo que $20,1 \pm 0,03$ % delas apresentavam-se com CL no início dos tratamentos.

Os animais foram mantidos no sistema extensivo utilizando a *Brachiaria sp.* como pastagem predominante. O fornecimento de água e mistura mineral foi *ad libitum*, por meio de bebedouros artificiais e cochos cobertos, respectivamente.

5.2.2. Protocolos e manejos

As vacas e novilhas foram submetidas à sincronização da ovulação com a inserção do dispositivo intravaginal novo, previamente utilizado por 7 e 14 dias contendo 1,9 g de P4 (CIDR®, Zoetis Saúde Animal) e aplicação via i.m. de 2,0 mg de BE (Estrogin®, Biofarm), sendo considerado este o dia zero (d0) do protocolo. No tratamento (5d-eCG) foi aplicada via i.m. 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis Saúde Animal) no dia cinco (d5) do protocolo. O dispositivo permaneceu por 7 dias quando foi retirado e concomitantemente aplicado via i.m. 300 UI de eCG no tratamento (7d-eCG), além de 0,6 mg via i.m. de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis Saúde Animal) e 25 mg de PGF (Lutalyse®, Dinoprost Trometamina, Zoetis Saúde Animal) em ambos os tratamentos (Figura 7). Nas novilhas utilizaram-se o mesmo protocolo de sincronização, porém com inserção de um CIDR previamente utilizado por 21 dias.

No dia da retirada do dispositivo de P4 (D7) foi colocado um adesivo (EstroTECT™), na base da cauda, que auxilia na detecção do estro, com objetivo de detectar quais fêmeas aceitaram mais de uma monta até o momento da inseminação (IA).

Figura 7 - Modelo esquemático dos protocolos e manejos a serem executados segundo cada tratamento.

BE: Benzoato de estradiol; CIDR: Progesterona; PGF: Prostaglandina; eCG: Gonadotrofina coriônica equina; ECP: Cipionato de estradiol; US: Ultrassonografia; Sg: Colheita de sangue.

Para avaliar o diâmetro folicular e do corpo lúteo foi realizado exame ginecológico com auxílio de ultrassonografia utilizando o aparelho Mindray® DP-2200Vet com transdutor linear (7,5 MHz). O exame ginecológico foi realizado no D0

para avaliar a presença ou ausência de corpo lúteo (CL), no momento da IA o diâmetro do folículo ovulatório ($\emptyset$ FO) e 10 dias após a IA o diâmetro do corpo lúteo ($\emptyset$ CL) pós ovulação. Para analisar a taxa de ovulação foi realizada US 10 dias após a IATF em 30% das vacas de cada tratamento, juntamente com a posterior análise da concentração de P4. Posteriormente, 30 dias após a IA, foi realizado um novo exame para diagnóstico de prenhez.

A inseminação, em ambos os tratamentos, foi realizada cerca de 55 horas após a retirada do CIDR utilizando sêmen convencional de quatro touros Nelore.

5.2.3. Colheita e análise de amostras

Conforme demonstrado na Figura 6, foram colhidas amostras de sangue para determinação das concentrações séricas de P4 e confirmação da ovulação 10 dias após a IA. Essas amostras foram obtidas através de venopunção da veia coccígea utilizando tubos Vacutainer® com gel separador de coágulo. Posteriormente essas amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 10 minutos, para separação do soro, que foi armazenado em tubos Eppendorf®, identificados e congelados a -18°C, para posterior análise.

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). A concentração sérica de P4 foi determinada através do método de quimioluminescência, com o auxílio de kits comerciais de IMMULITE® 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA), com limite mínimo de 0,20 ng/mL e máximo de 20 ng/mL. O coeficiente de variação foi de 1,27% para o controle baixo e 2,37% para o controle alto de intra-ensaio. Vacas que apresentaram valores de P4 < 2,0 ng/ml 10 dias após IATF 5,4 % (7/129) do 5d-eCG e 6,2 % (9/145) do 7d-eCG foram retiradas da análise, pois, foi definido que essas vacas não ovularam ao protocolo.

5.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizado, sendo o lote incluso no modelo como bloco. Foi avaliado o efeito de lote e se o mesmo não interagiu com o tratamento. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote SAS 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). As variáveis contínuas como diâmetro folicular no momento da IATF, diâmetro do corpo lúteo 10 dias pós IATF e concentração sérica de P4 10 dias pós IATF foram analisadas pelo PROC MIXED sendo que o peso e ECC foram inclusos no modelo como covariável quando estes foram significativos e não apresentaram interação com o tratamento. As variáveis foram testadas quanto a normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk, com retirada de “outliers” e transformação dos dados quando necessário. Na variável diâmetro folicular, os “outliers” retirados foram vacas que apresentaram cisto e as que ovularam antes da IATF. Além disso, todos os dados foram submetidos a homogeneidade das variâncias pelo Bartlett’s test e as médias ajustadas através do *lsmeans*.

As variáveis binomiais como taxa de detecção de estro, ovulação e prenhez foram analisadas pelo PROC GLIMMIX e as médias foram obtidas através do PROC MEANS. O efeito da concentração de progesterona sobre a taxa de prenhez foi analisado por regressão logística (procedimento LIFETEST). A curva de regressão logística foi criada utilizando o coeficiente do software e a fórmula $y = \text{EXP}(a \times x + b) / [1 + \text{EXP}(a \times x + b)]$. Diferenças significativas foram consideradas com uma probabilidade de $p < 0,05$.

5.3. RESULTADOS

As vacas tratadas com eCG no d5 do protocolo apresentaram maior ØFO ($11,70 \pm 0,37$ mm) em relação ao grupo 7d-eCG ($10,54 \pm 0,37$ mm) ($p < 0,01$), e maior concentração sérica de P4 ($4,66 \pm 0,23$ e $4,30 \pm 0,23$ ng/ml; $p = 0,04$), respectivamente. Na análise do diâmetro folicular, observaram-se vacas com cistos (folículo > 18 mm), sendo 1,2 % (4/341) do tratamento 5d-eCG e 0,9 % (3/340) do 7d-eCG, e vacas que provavelmente ovularam antes da IATF (folículo < 6 mm) 2,0 % (7/341) e 0,6 % (2/340), respectivamente.

Não houve diferença no ØCL ($14,9 \pm 0,24$ e $14,8 \pm 0,24$ mm; $p = 0,55$), na taxa de ovulação 90,2% (129/143) e 92,9% (145/156) ($p = 0,39$), na taxa detecção de estro 67,7% (231/341) e 62,3% (212/340) ($p = 0,14$) e na taxa de prenhez 52,5% (179/341) e 52,3% (178/340) ($p = 0,96$) no grupo 5d-eCG em relação ao grupo 7d-eCG, respectivamente (Tabela 5). No entanto, foi observado efeito de lote ($p < 0,01$) sobre a taxa de prenhez, porém não houve interação do lote com o tratamento. Além disso, houve diferença na taxa de prenhez independente do tratamento ($p < 0,01$), quando se comparou vacas detectadas em estro 59,6% (264/443) em relação as que não apresentaram estro 39,1% (93/238) (Figura 8). Outro parâmetro observado foi que a probabilidade de prenhez pode aumentar a medida que a concentração de P4 é maior ($p = 0,02$) (Figura 9).

Tabela 5 - Parâmetros reprodutivos de vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4 com aplicação de eCG no d5 e d7

Parâmetros	Tratamentos		Valor P
	5d-eCG	7d-eCG	
Diâmetro folicular na IATF (mm) ^a	$11,70 \pm 0,37$	$10,54 \pm 0,37$	<0,01
Diâmetro do CL no d19 (mm) ^a	$14,89 \pm 0,24$	$14,79 \pm 0,24$	0,55
Concentração de P4 no d19 (ng/mL) ^{a*}	$2,24 \pm 0,05$	$2,16 \pm 0,05$	0,04
Taxa de ovulação (%) ^b	90,2 (129/143)	92,9 (145/156)	0,39
Taxa de estro (%) ^b	67,74 (231/341)	62,35 (212/340)	0,14
Taxa de prenhez (%) ^b	52,49 (179/341)	52,35 (178/340)	0,96

^a média $\pm$ erro padrão da média

^b média (N observado/N total)

*valores apresentados com transformação ($\sqrt{P4 + \frac{1}{2}}$); valores reais: 5d-eCG ($4,63 \pm 0,23$) e 7d-eCG ($4,30 \pm 0,23$).

Figura 8 - Taxa de prenhez de acordo com a manifestação de estro em vacas Nelore lactantes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4

Média (N observado/N total)

Valor de $p < 0,01$.

Novilhas tratadas com eCG no d5 do protocolo apresentaram maior ØFO ($11,64 \pm 0,20$ mm) em relação ao grupo 7d-eCG ($10,88 \pm 0,20$ mm) ($p = 0,01$), e ØCL ($15,34 \pm 0,24$ e $14,24 \pm 0,24$ mm; $p < 0,01$), respectivamente. No entanto, não houve diferença na concentração de P4 10 dias pós IATF ($5,21 \pm 0,26$ e $5,07 \pm 0,25$ ng/mL; $p = 0,71$), e na taxa de prenhez 37,4% (34/91) e 43,9% (40/91) ($p = 0,36$) entre os grupos 5d-eCG e 7d-eCG, respectivamente. A taxa de detecção de estro foi menor ($p = 0,02$) no 5d-eCG 84,6% (77/91) em relação ao 7d-eCG 95,6% (87/91) e a taxa de ovulação não diferiu ($p = 0,11$) 88,7% (71/80) e 95,9% (71/74) (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros reprodutivos de novilhas Nelore púberes submetidas a protocolo de 7 dias de dispositivo de P4 com aplicação de eCG no d5 e d7

Parâmetros	Tratamentos		Valor P
	5d-eCG	7d-eCG	
Diâmetro folicular na IATF (mm) ^a	$11,64 \pm 0,20$	$10,88 \pm 0,20$	0,01
Diâmetro do CL 10d pós IATF (mm) ^{a*}	$2,78 \pm 0,01$	$2,71 \pm 0,01$	<0,01
Concentração de P4 10d pós IATF (ng/mL) ^a	$5,21 \pm 0,26$	$5,07 \pm 0,25$	0,71
Taxa de ovulação (%) ^b	88,7 (71/80)	95,9 (71/74)	0,11
Taxa de detecção de estro (%) ^b	84,6 (77/91)	95,6 (87/91)	0,02
Taxa de prenhez (%) ^b	37,4 (34/91)	43,9 (40/91)	0,36

*valores apresentados com transformação (*log*); valores reais: 5d-eCG ($15,34 \pm 0,24$) e 7d-eCG ($14,24 \pm 0,24$)

^a Média $\pm$ erro padrão da média

^b Média (N observado/N total)

Figura 9 - Probabilidade de prenhez de acordo com a concentração sérica de P4 dez dias após IATF de vacas Nelore lactantes

5.4. DISCUSSÃO

Vacas tratadas com eCG no d5 (5d-eCG) do protocolo apresentaram maior diâmetro de folículo ovulatório, e maior concentração sérica de P4 em relação ao d7 (7d-eCG). O folículo ovulatório pequeno resulta em um CL com baixa capacidade de produção de P4 ocasionando redução na taxa de prenhez (PERRY et al., 2005). A medida que se aumenta as concentrações de P4 nos primeiros dias após a IATF ocorre maior crescimento embrionário (CARTER et al., 2008) e maior secreção de interferon-tau por esse embrião (MANN, et al., 1999), podendo prevenir perdas por falha no reconhecimento materno da gestação aumentando a taxa de prenhez e sobrevivência embrionária (BELTMAN et al., 2009).

O maior folículo ovulatório no grupo tratado com eCG no d5 pode ter ocorrido devido a maior capacidade esteroidogênica desse folículo sob efeito de eCG (LUCY, 2001; BARUSELLI et al., 2004b). Além disso, por ter uma meia vida longa (3 dias; MURPHY E MARTINUK, 1991) quando aplicado no d5 o eCG permanece por mais tempo na corrente sanguínea (até 10 dias após aplicação), como observado por

Menzer e Schams, (1979) permitindo o maior crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2004b). Em vacas de corte em anestro pós parto o incremento no crescimento folicular pode ser um fator importante, pois, vacas de corte com folículos ovulatórios maiores apresentam maior taxa de ovulação e maior taxa de prenhez (BÓ et al, 2007; PERRY et al, 2007; SÁ FILHO et al., 2010).

Nesse estudo, apesar de não apresentarem um maior diâmetro de CL em relação ao 7d-eCG, as vacas do grupo 5d-eCG tiveram maior concentração sérica de P4 10 dias após a inseminação. Apesar da semelhança no diâmetro do CL, o mesmo pode ter produzido maior quantidade de P4 por ser oriundo de um folículo maior no tratamento 5d-eCG. Esse resultado confirma a hipótese de que a antecipação da aplicação do eCG aumenta a produção de P4 após a IATF como já foi descrito em outros trabalhos com uso de eCG (PERES et al., 2009; TORTORELLA et al., 2013; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, a maior concentração de P4 pós IATF independente do tratamento foi suficiente para aumentar a probabilidade de prenhez (Figura 8).

Em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de P4 ao final do protocolo, principalmente quando utiliza-se dispositivos de P4 novos em vacas ciclando, o eCG aumenta a taxa de ovulação (BARUSELLI et al., 2004b; SÁ FILHO et al., 2010; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Neste trabalho a antecipação da aplicação do eCG não afetou a taxa de ovulação em relação ao grupo em que o eCG foi aplicado no momento da retirada do dispositivo, resultado semelhante ao observado por Tortorella et al., 2013. Isso provavelmente ocorreu por ser utilizado em vacas no pós parto curto com baixa taxa de ciclicidade, ou seja, não houve influência de altos níveis de P4 sobre o crescimento folicular e ovulação como nos trabalhos descritos acima.

Vacas que manifestam estro em protocolos de IATF apresentam maior taxa de prenhez comparadas às que não manifestam estro (SÁ FILHO et al., 2011). A aplicação de eCG no d5 não afetou a taxa de detecção de estro em vacas. No entanto, houve uma diferença na taxa de prenhez quando compararam-se vacas que apresentaram estro com as que não apresentaram, independente do tratamento.

Apesar de haver um aumento no diâmetro folicular e concentração sérica de P4, a taxa de prenhez entre os grupos tratados foi semelhante 5d-eCG e 7d-eCG, não confirmando parte da hipótese deste trabalho. No entanto, foi maior que a encontrada por Tortorella et al., (2013) utilizando eCG no dia 6 (27,3%) e dia 8 (16,0%). Segundo

os autores a baixa taxa de prenhez pode ter ocorrido devido ao estresse nutricional pelo qual as vacas se encontravam. Já no presente estudo, a melhor condição nutricional na qual os animais se encontravam possibilitou maior taxa de prenhez em ambos os tratamentos.

Outra possibilidade que pode ter ocorrido com a antecipação da aplicação do eCG está relacionada ao fato de que um folículo jovem (< 6 mm) tenha poucos receptores para LH em relação a folículos maiores (BEG et al., 2001; RAWAN et al., 2015). Em protocolos de IATF, uma nova onda de crescimento folicular inicia-se por volta de 3-4 dias após o início do protocolo (BÓ et al., 2003) quando é possível observar através de ultrassonografia folículos com 4 mm de diâmetro (GINTHER et al., 2001). Dessa forma, com a aplicação do eCG no dia 5, provavelmente os folículos maiores estavam com cerca de 6 mm de diâmetro, ou seja, não apresentavam receptores para LH nas células da granulosa suficientes para que o eCG se ligar e estimular o crescimento folicular. Portanto, apesar do aumento no diâmetro folicular, o 5d-eCG não aumentou a taxa de prenhez, ou seja, esse folículo maior pode não ter produzido uma maior quantidade de estradiol o que levou a um resultado de prenhez semelhante entre os tratamentos.

5.5. CONCLUSÕES

A antecipação da aplicação de eCG em 2 dias antes da retirada do dispositivo de P4 (d7) aumentou o diâmetro do folículo ovulatório e a concentração sérica de P4 em vacas lactantes, porém não houve diferença na taxa de prenhez dos grupos tratados. Em novilhas, o diâmetro folicular e luteal foi afetado pela antecipação do eCG, porém também não afetou a taxa de prenhez. A maior detecção de estro e a concentração de P4 10 dias pós inseminação influenciaram positivamente a taxa de prenhez em vacas independente do tratamento.

REFERÊNCIAS

- BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O.; RODRIGUES, C. A.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; REIS, E. L.; SÁ FILHO, M. F. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise retrospectiva). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32. p. 228, 2004a. Trabalho apresentado a 18. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita, 2004.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004b.
- 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, p. 432–441, 2001.
- 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.
- BÓ, G.A. BARUSELLI, P.S. MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.
- BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. In: JUENGEL, J. L.; MURRAY, J. F.; SMITH, M. F. (Ed.). **Reproduction in domestic ruminants VI**. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p. 223-236.
- 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.
- CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; MORENO, D.; BÓ, G. A. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v. 59, p. 216, 2003 (Abstract).

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 638-647, 2001.

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, 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.

MARQUES, M. O.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; FIGUEIREDO, T. B.; SORIA, G. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com PGF2a na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 287-287, 2005. Suplemento 1. Trabalho apresentado a 19th Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting, Angra dos Reis, 2005. (Resumo)

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

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, 2012.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27-44, 1991.

NÚÑEZ-OLIVERA, R.; CASTRO, T.; GARCÍA-PINTOS, C.; BÓ G.; PIAGGIO, J.; MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol-based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111–116, 2014.

PERES R. F. G.; CLARO JÚNIOR I.; SÁ FILHO O. G.; NOGUEIRA G. P.; VASCONCELOS J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.72, p.681–689, 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.

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

RAWAN, A. F.; YOSHIOKA, S.; ABE, H.; ACOSTA, T. J. Insulin-like growth factor-1 regulates the expression of luteinizing hormone receptor and steroid production in bovine granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 283–291, 2015.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JUNIOR, J. R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO, E. P. L. A.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p. 455-463, 2011.

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.

SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology** v. 71, p. 698–706, 2009.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527-36, 1981.

TORTORELLA, R. D.; FERREIRA, R.; SANTOS J. T.; ANDRADE NETO O. S.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B.; NEVES, J. P. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204-1209, 2013.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante deste trabalho, é notável a viabilidade da redução no tempo de permanência do CIDR de 9 para 7 dias. Isso possibilitou a reutilização do mesmo por até 5 vezes em vacas e 6 em novilhas. No entanto é imprescindível fazer a limpeza eficaz e armazenamento em local adequado dos dispositivos após cada uso. Além disso, fatores como a fertilidade do sêmen mostrado no presente estudo, saúde reprodutiva e estado nutricional da fêmea estão diretamente relacionados com os resultados encontrados à campo. Em relação a antecipação da aplicação do eCG, recomenda-se que a mesma seja realizada no momento da retirada do dispositivo, já que sua antecipação acarretou um manejo a mais e não aumentou a taxa de prenhez. Garantir a eficiência do protocolo é apenas um dos fatores ligados a melhoria na eficiência reprodutiva. Portanto, um manejo adequado dos aspectos descritos acima é fundamental para o sucesso dos programas de IATF.