

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE
PROGESTERONA NAS RESPOSTAS AO PROTOCOLO DE
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS NELORE CÍCLICAS

CAROLINA CASTILHO DIAS

BOTUCATU - SP

JULHO/2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE
PROGESTERONA NAS RESPOSTAS AO PROTOCOLO DE
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS NELORE CÍCLICAS

CAROLINA CASTILHO DIAS

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para obtenção do título de mestre

Orientador: **Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos**

BOTUCATU – SP

JULHO/2007

CONTITUIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome: Dias, Carolina Castilho

Título: Avaliação dos efeitos da concentração de progesterona nas respostas ao protocolo de sincronização da ovulação em novilhas nelore cíclicas

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de mestre

Data: 23 de julho de 2007.

Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos (FMVZ/UNESP/Botucatu)

Prof. Titular Dr. Ciro Moraes de Barros (IBB/UNESP/Botuvatu)

Prof. Titular Dr. Pietro Sampaio Baruselli (VRA/USP/Pirassununga)

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais Ana e Ari por todo o apoio durante toda a minha formação, mas principalmente, por todos os ensinamentos de amor e caráter que me fizeram como sou e por toda a dedicação a mim e ao meu irmão.

Ao meu irmão Felipe, minha madrinha Sílvia e meus avós Lourdes, Chico, Dalva e Mário (*in memorian*) por sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado Rodrigo simplesmente por me fazer feliz estando ao meu lado sempre, pelo amor, carinho, respeito, por todos os momentos maravilhosos e também pela paciência muitas vezes.

Aos meus amigos de verdade, em especial a “família”, principalmente a Mariana (Kumeta), Fernanda (Vomitinho), Isabel (2-Bigo), Felipe (Merlim) e Gustavo (Kremoso) e a Geovana por tornarem esses últimos dois anos especiais e felizes.

E aos meus amores Jade e Malú e aos irmãozinhos Naomi, Grampola, Faruk, Morfina, Scoth, Meg (*in memorian*) e Fumica (*in memorian*) que muitas vezes me entenderam melhor do que ninguém e é claro pelo amor incondicional.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo José Luiz pela imensa ajuda e importantes ensinamentos para minha formação, mas principalmente, pela amizade, paciência e por respeitar meu amadurecimento e crescimento.

À Prof^a Dr^a Eunice Oba pelo ensinamentos e pela paciência durante os ensaios de progesterona e pela disponibilização do laboratório sempre que requisitado.

Ao Prof. Dr. Francisco Stefano Weschler por todos os ensinamentos e pela orientação por tantas vezes solicitada para as análises estatísticas.

Aos amigos Tiago, Mauro, Bia, Aydson, e Izaías pelo prazeroso convívio.

Aos amigos Gabriela e Rogério pelo prazeroso convívio e principalmente pelo valoroso auxílio durante a execução do experimento.

À amiga Ricarda pelos inúmeros ensinamentos e orientações dispensados durante a graduação e pós-graduação, que foram absolutamente importantes e valiosos para minha formação e pela valorosa amizade.

À toda a equipe da Pecuária Novo Horizonte (Coxim-MS) pela disponibilidade das novilhas, mas principalmente pela atenciosa hospitalidade. Agradecimento especial aos médicos veterinários Moacir e Adriano pelos ensinamentos durante minha estadia.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Exploração Animal – Lageado, Barbosa e Solange, pela amizade, simpatia e atenção dispensada.

Ao CNPQ, pela importante bolsa concedida

A todos vocês muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Particularidades do gado <i>Bos Indicus</i>	
2.2. Sincronização do estro e da ovulação.....	
3. MATERIAL E MÉTODO	
4. RESULTADOS	
5. DISCUSSÃO	
6. CONCLUSÕES	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 1: Tempo e variação da emergência da nova onda folicular após a aplicação de 5mg de Estradiol-17 β , 1 ou 2 mg de Benzoato de Estradiol, 5mg de Valerato de Estradiol e 1mg de Cipionato de estradiol.

RESULTADOS

TABELA 2: Taxa de sincronização e concepção das novilhas tratadas com protocolo de sincronização da ovulação de acordo com a classe de diâmetro folicular no momento da IATF. Botucatu - SP, 2007.

TABELA 3: Taxa de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com a classe de diâmetro folicular no momento da IATF por número de utilizações do CIDR. Botucatu - SP, 2007.

LISTA DE FIGURAS

RESULTADOS

FIGURA 1: Máximo diâmetro folicular a IATF de acordo com a concentração de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

FIGURA 2: Probabilidade de sincronização de acordo com o máximo diâmetro folicular a IATF do protocolo de sincronização da ovulação ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

FIGURA 3: Probabilidade de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o a concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação. ($P < 0,1$). Botucatu - SP, 2007.

FIGURA 4: Probabilidade de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o máximo diâmetro folicular a IATF. ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

FIGURA 5: Probabilidade de prenhez das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o a concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação. ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR [®]	- Controlled Internal Drug Release
CL	- Corpo lúteo
CV	- Coeficiente de variação
d	- Dia
E ₂	- Estradiol
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	- Inseminação artificial
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
TE	- Transferência de embrião
TETF	- Transferência de embrião em tempo fixo
IFN _τ	- Interferon - tau
Kg	- Kilogramas
LH	- Hormônio luteinizante
mg	- Miligramas
mL	- Mililitro
ng	- Nanograma
P	- Nível de significância
P ₄	- Progesterona
PGF _{2α}	- Prostaglandina F _{2α}
US	- Ultra-som
[P ₄ d0]	- Concentração Sérica de Progesterona no dia 0
[P ₄ d7]	- Concentração Sérica de Progesterona no dia 7
∅ Fol	- Diâmetro do maior folículo no momento da IATF
mm	- milímetros
BE	- Benzoato de estradiol
ECP	- Cipionato de estradiol
PIB	- Produto interno bruto
FD	- Folículo dominante

FS	- Folículo subordinado
FP	- Folículo persistente
Ø CL	- Diâmetro do corpo lúteo
OBS CIO	- Observação de cio
VE	- Valerato de estradiol
H	- hora
ECG	Gonadotrofina coriônica equina
RNA	- ácido ribonucleico
FN	- Folículos normais
ECC	- Escore de condição corporal
DG	- Diagnóstico de gestação
MHz	- megahertz
µl	- microlitros
log	-Logarítmo
pg	- picogramas

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA NAS RESPOSTAS AO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS NELORE CICLICAS.

RESUMO – O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da concentração sérica de progesterona ([P₄]) nos dias (d) 0 e/ou d7 do protocolo de sincronização da ovulação e da reutilização de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) nos resultados a IATF em novilhas Nelore ciclando (n=398). O protocolo utilizado foi: d0-CIDR[®] [sem utilização prévia (1^ouso), previamente utilizados por 9d (2^ouso) ou 18d (3^ouso)]+BE(2mg)+amostra de sangue para dosagem [P₄], d7-PGF2 α (12,5mg)+amostra de sangue para dosagem [P₄], d9-retirada do CIDR[®]+ECP(1mg), d11-IATF+mensuração do \emptyset Fol, d13-avaliação da ovulação e d41-diagnóstico de gestação. Variáveis contínuas foram analisadas pelo PROC-GLM e binomiais pelo PROC-LOGISTIC do SAS. Foi considerada diferença estatística P<0,05 e tendência P<0,1. A [P₄d0] influenciou de forma positiva \emptyset Fol, concepção e prenhez. A [P₄d7] não influenciou os parâmetros avaliados. O \emptyset Fol, foi menor para 1^ouso (10,1 \pm 0,19mm) do que 3^ouso (11,0 \pm 0,21mm) e 2^ouso (10,6 \pm 0,20mm) não diferiu dos demais. A taxa de sincronização das classes de \emptyset Fol diferiram entre si (Classe1: \emptyset Fol<8,5, 28,2%, Classe2:8,5-10,0, 62,5%, Classe3:>10mm, 92,2%. A taxa de concepção das classes de \emptyset Fol foi avaliada de acordo com o número de utilizações do CIDR[®] no 1^o e 2^o usos as classes 1 e 2 tiveram menor concepção do que a Classe3, mas no 3^ouso as classes tiveram concepção similar (Classe1, 9,1%, 0%, 40,0%, Classe2: 24,0%, 21,7%, 54,5% Classe3, 52,4%, 48,9%, 53,8%, 1^o, 2^o e 3^ousos respectivamente). A taxa de concepção, tendeu a ser maior com 3^ouso (53,2%) que 1^ouso (37,2%) e 2^ouso (37,8%). A taxa de prenhez, foi maior com 3^ouso (35,5%) que 1^ouso (20,5%) e 2^ouso (22,7%).

Palavras chave: novilhas, progesterona, prenhez, proestro e Nelore.

EVALUATION OF SERUM PROGESTERONE CONCENTRATION DURING FIXED TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION PROTOCOL IN NELLORE CYCLING HEIFERS

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate if progesterone concentrations [P₄] on d0 and/or d7 of a protocol and if reutilization of intravaginal progesterone devices (CIDR[®]) could affect FTAI success in Nellore cycling heifers. Heifers (n=398) received the protocol: d0: CIDR[®] (with no previous use (1stuse), previously used for 9d (2nduse) or previously used for 18d (3rduse)) + EB(2mg) + blood samples to determine [P₄d0], d7: PGF2 α + blood sample to determine [P₄d7], d9: CIDR[®] withdraw + ECP(1mg), D11: FTAI + largest follicle diameter measurement (\emptyset Fol), D13: check ovulation and D41: pregnancy diagnoses. Continuous variables were analyzed by PROC-GLM and binomial by PROC-LOGISTIC of SAS. Statistical difference was considered with P<0,05 e tendency P<0,1. The [P₄d0] positively influenced \emptyset Fol, conception and pregnancy rates. The CIDR[®] number of uses influenced [P₄d7] (1stuse 2.4 \pm 1.1; 2nduse 2.0 \pm 1.0 and 3rduse 1.7 \pm 1.1ng/ml), but [P₄d7] didn't influence studied parameters. The \emptyset Fol, was smaller on 1stuse (10,1 \pm 0,19mm) compared to 3rduse (11,0 \pm 0,21mm) and 2nduse (10,6 \pm 0,20mm) didn't differ from others. Synchronization of \emptyset Fol classes differed (Class1: \emptyset Fol<8.5, 28,2%, Class2:8.5-10.0, 62.5%, Class3:>10mm, 92,2%). Conception of \emptyset Fol classes were evaluated by CIDR[®] number of uses. On 1st and 2nduse classes1 and 2 had lower conception compared to class3, but on 3rduse classes conceptions were similar (Class1, 9.1%, 0%, 40.0%, Class2: 24.0%, 21.7%, 54.5% Class3, 52.4%, 48.9%, 53.8%, 1st, 2nd and 3rduse, respectively). Conception tended to be higher on 3rduse (53.2%) compared to 1stuse (37.2%) and 2nduse (37.8%). Overall pregnancy was higher on 3rduse (35.5%) compared to 1stuse (20.5%) and 2nduse (22.7%).

1. INTRODUÇÃO

O PIB (produto interno bruto) da pecuária foi de R\$ 64,8 bilhões no ano de 2006 (CEPEA), e a bovinocultura de corte produziu aproximadamente 7 milhares de toneladas de equivalente de carcaça, com 2 milhares de toneladas de equivalente de carcaça de carne exportadas (Anualpec, 2006).

O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 164 milhões de cabeças divididas em 130 milhões animais de corte (79%) e 34 milhões leiteiros (21%, Anualpec, 2006). No caso das raças de corte, a raça Nelore e seus cruzamentos somam 90 milhões de cabeças, constituindo-se em uma raça de grande interesse comercial. (Genoma, 2003).

A inseminação artificial (IA) é a principal tecnologia de que os produtores de gado de corte dispõem para introduzir genética em seus rebanhos. As novilhas são excelentes candidatas a implantação dos programas de IA, pois estas devem representar o melhor resultado do incremento genético realizado no rebanho. No entanto, para a IA convencional, é necessária a observação do estro, que é um ponto crítico, principalmente em fêmeas de raças zebuínas. Estas fêmeas apresentam estro de menor duração quando comparadas as fêmeas taurinas (12,9h vs 16,3h; Bó et al, 2003) e de maior probabilidade de ocorrência noturna, iniciando-se durante a noite (60%) ou mesmo ocorrendo apenas durante o período noturno (40%; Pinheiro et al., 1998).

Para otimizar a utilização da IA, foram desenvolvidos tratamentos que permitem a inseminação de 100% dos animais trabalhados em tempo pré-determinado (IATF), sem necessidade da observação de cio, permitindo o manejo concentrado dos animais, facilitando a distribuição da mão de obra na fazenda (Pursley et al., 1995, Day, 2005a).

No entanto, as taxas de fertilidade a IATF em novilhas não são equivalentes as taxas de fertilidade observadas nos sistemas que utilizam a detecção de estro (Lamb et al, 2000, 2006 Paterson et al, 2003, Day, 2005a). As causas desta menor fertilidade podem estar relacionadas a taxa de sincronização (Pursley et al, 1995, Sá Filho et. al., 2005) ou a fatores que influenciam a taxa de concepção. Dentre os

fatores que podem influenciar a concepção temos a maturidade do folículo dominante induzido a ovular ou ao ambiente uterino gerado durante e após o desenvolvimento folicular. Estes fatores influenciam a taxa de prenhez por diminuírem a taxa de concepção nos animais sincronizados (Perry et. al., 2004, Mussard et. al., 2002, Mussard et. al, 2003, Sirous e Fortune, 1990, Mihm et. al., 1994, Revah e Buttler, 1996).

Sugeriu-se recentemente que, em novilhas *Bos indicus*, devido a alta concentração sanguínea circulante de P_4 atingida com a utilização de dispositivo intravaginal de P_4 (CIDR) sem utilização prévia, a taxa de ovulação foi baixa, 39,1% (9/23), e que este tratamento apresenta baixo potencial de utilização para IATF nesta categoria animal (Carvalho, 2004).

O presente estudo tem como objetivo estudar a influência da concentração sérica de P_4 em dois momentos em um protocolo de sincronização da ovulação (dia 0, início do protocolo e dia 7, momento pr'oximo ao esperado para o desvio folicular) no maior diâmetro folicular a IATF, nas taxas de ovulação, sincronização, concepção e prenhez a IATF em novilhas Nelore ciclando.

HIPÓTESES DO TRABALHO

As hipóteses deste estudo são:

- 1) A concentração sérica de P_4 no início do protocolo não interfere nos resultados a IATF.
- 2) A concentração sérica de P_4 no dia 7 do protocolo não infere nos resultados a IATF, devido a indução da luteólise neste momento.
- 3) A concentração residual de progesterona entre os dias 7 e 9, proveniente apenas dos dispositivos de P_4 , não é suficiente para influenciar os resultados a IATF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Particularidades do gado *Bos indicus*

Informações sobre a dinâmica do crescimento folicular, podem facilitar a obtenção de mecanismos para seu controle, que é altamente desejado no desenvolvimento de protocolos de sincronização do cio e ovulação. Investigações anteriores revelaram algumas diferenças entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Figueiredo et. al. (1997), observaram que na raça Nelore, as vacas (83,3%) tendem a apresentar duas ondas de crescimento folicular e as novilhas (64,7%) três ondas, enquanto novilhas holandesas tendem a apresentar 2 ondas (55,5%) de crescimento folicular (Sartori et. al., 2004).

Quanto a divergência folicular, Sartorelli et al. (2005) relataram que em novilhas Nelore o diâmetro do FD no momento da divergência foi de $5,7 \pm 0,2$ mm, foi menor quando comparado ao diâmetro folicular descrito anteriormente para novilhas holandesas (FD: 8,5 mm e FS: 7,2 mm, Sartori et al., 2001) e similar aos achados de Castilho et al., (2007, $5,4 \pm 0,4$ mm) e Gimenes et al. (2007, $6,2 \pm 0,2$ mm). Em estudo recente, a diferenciação no diâmetro ocorreu apenas 24 h após a divergência (FD $7,6 \pm 0,4$ mm e maior subordinado $5,3 \pm 0,4$ mm, $P > 0,05$, Castilho et al, 2007).

Carvalho (2004) observou menor diâmetro do FD (FD $9,5 \pm 0,5$ mm) ao final de um protocolo, e taxa de crescimento folicular durante o mesmo nas novilhas *Bos indicus* ($0,9 \pm 0,1$ mm/dia) em relação a novilhas *Bos taurus* (FD: $11,6 \pm 0,5$ mm, taxa de crescimento: $1,1 \pm 0,1$ mm/dia).

Informações sobre a relação entre o diâmetro folicular e a aquisição da capacidade ovulatória, permitem entender falhas em tratamentos hormonais e podem facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos. Sartori et al. (2001), relataram que em gado holandês a aquisição da capacidade ovulatória foi observada em folículos a partir de 10 mm de diâmetro. No entanto, em novilhas Nelore folículos a partir de 7,0 a 8,4 mm foram capazes de ovular (33%, 3/9), mas a capacidade ovulatória aumentou significativamente conforme aumentou o diâmetro folicular (8,5 a 10 mm – 80%, 8/10 e > 10 mm –90 %, 9/10 (Gimenes et al.,2007). Embora a divergência folicular ocorra com um diâmetro menor em *Bos*

indicus, a capacidade ovulatória parece aumentar de acordo com o diâmetro folicular.

Ainda em relação a capacidade ovulatória, foi relatada menor taxa de ovulação ao estímulo de BE após sincronização com dispositivo intravaginal de P₄ para novilhas *Bos indicus* (39,1%, 9/23) quando comparadas a novilhas *Bos taurus* (72,7%, 16/22) e ao cruzamento entre *Bos indicus* X *Bos taurus* (84,0%, 21/25, Carvalho et al, 2004). No entanto, a taxa de ovulação foi maior nas novilhas *Bos indicus*, quando uma aplicação de PGF2 α foi administrada no início do protocolo de sincronização da ovulação (sem PGF2 α - 25,0%, 3/12 vs com PGF2 α - 54,5%, 6/11, Carvalho, 2004), sugerindo efeito negativo da P₄ durante o protocolo.

Outro fator que difere entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* é o comportamento de cio e o intervalo cio-ovulação, parâmetros essenciais para a escolha do melhor momento da IA. Fêmeas *Bos indicus* apresentam estro de menor duração e ovulação ocorrendo antes em relação ao momento do início do estro quando comparadas a fêmeas *Bos taurus* (*Bos indicus* 10 a 12,9 h e ovulação 25 a 26 h após o início do estro, *Bos taurus* 18 h e ovulação 28 a 32 h após o início do estro, Pinheiro et al., 1998 e apud Pinheiro et al., 1998 e Bó et al, 2003) e ao cruzamento entre *Bos indicus* X *Bos taurus* (Brahman 6,65 \pm 1,2 h, Angus 8,52 + 1,2 h, cruzamento 11,90 \pm 1,2 h; P = 0,03, Rahe et al., 1980). Além disso, foi observado menor número de montas durante o cio (Angus 19 \pm 3,6, Brahman 25 \pm 5,4, cruzamento 37 \pm 5,5 vezes, P = 0,02, Rahe et al., 1980) e maior incidência de cio de ocorrência noturna, iniciando-se durante a noite (53,8%) ou mesmo ocorrendo apenas durante o período noturno (34,6%; Pinheiro et al., 1998) Estas diferenças tornam a observação de estro um ponto ainda mais crítico a ser considerado no desenvolvimento de tratamentos de sincronização e tornam ainda maior a necessidade de desenvolver-se programas que resultem em bons resultados a IATF.

Quanto ao \emptyset CL, Figueiredo et. al. (1997) encontraram CL ligeiramente menor em fêmeas Nelore (17,7 \pm 0,4 mm) quando comparadas a observações anteriores em taurinas (20 a 25 mm, Thatcher et al., 1993, Adams et al, 1993 e

Hafez, 1993). Carvalho (2004) observou \varnothing CL similar em novilhas Nelore ($13,5 \pm 0,5$) e Angus ($15,3 \pm 0,8$), mas diferente entre novilhas Gir ($17,6 \pm 0,7$ mm) e Holandesas ($22,4 \pm 0,5$ mm). A diferença no diâmetro do CL tem implicações importantes pois altera a concentração de progesterona circulante (Vasconcelos et al, 2001).

2.2. Protocolos utilizados para sincronizar a ovulação em novilhas

Estratégias que permitem a sincronização da onda folicular

Para facilitar a utilização da IA, foram desenvolvidos tratamentos que permitem a inseminação de 100% dos animais trabalhados em tempo pré-determinado, sem necessidade da observação de cio, permitindo o manejo concentrado dos animais, facilitando a distribuição da mão de obra na fazenda (Pursley et al., 1995). Estes tratamentos visam controlar sequencialmente a dinâmica folicular ovariana, a luteólise e a ovulação. Com isso, o controle do desenvolvimento folicular é mais preciso.

Existem 3 maneiras de sincronizar a onda folicular. Uma é mecânica e consiste na aspiração folicular guiada por ultra-som de folículos com diâmetro acima de 5 mm, iniciando uma nova onda em torno de $1,9 \pm 0,1$ dias após o procedimento, com grande sincronia (Buratini, 2000). No entanto, este procedimento além da necessidade de um ultra-som, é inviável para um grande número de animais. Assim, as estratégias mais utilizadas para sincronizar o início da nova onda folicular são hormonais, o GnRH e o estradiol associado a progesterona.

O GnRH age diretamente na hipófise, induzindo a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Em torno de 30 minutos após sua administração, ocorre pico de LH e 24 a 32 horas após a ocorre a ovulação do folículo dominante. Quando o GnRH é utilizado para sincronizar a nova onda folicular, o período de tempo a ser considerado para início da nova onda é de aproximadamente 2 dias (Pursley, 1995).

No entanto, a capacidade do GnRH em iniciar uma onda folicular é limitada (vacas de corte - 66%, Geary et. al., 2000, vacas de leite - 64% de ovulação, Vasconcelos et. al., 1999), principalmente em novilhas (56%, Pursley et al, 1995). A falha na ovulação ao primeiro GnRH resulta em variação no diâmetro do folículo dominante no momento da indução do pico de LH nos protocolos de IATF, podendo comprometer a taxa de sincronização (Santos et. al., 2003) e/ou concepção/prenhez (Perry et. al., 2004).

Quanto a utilização o estradiol (E_2) associado a P_4 , Burke et. al, 1996, relataram que em vacas ovariectomizadas, a P_4 inibiu por curto período a secreção de LH (36h) e não teve efeito sobre a secreção de FSH. Entretanto, a supressão de LH foi prolongada pela adição de BE ao início do tratamento com CIDR[®] e neste caso a secreção de FSH também foi deprimida. Assim sendo, a administração conjunta de P_4 e E_2 promove supressão de LH e FSH e provavelmente resulta em atresia independentemente da idade ou diâmetro folicular, promovendo início sincronizado de uma nova onda (Burke et al., 2001, Bó et al., 2003).

O tempo entre a administração de estradiol e o início da nova onda varia principalmente de acordo com a fonte e dose de estradiol utilizadas, sendo este um fator importante a ser considerado quando se avalia a resposta obtida com a utilização de certos protocolos (Burke et al., 2002). A modificação do momento do início da nova onda pode alterar a porcentagem de sucesso de sincronização do protocolo e/ou algumas características do folículo ovulatório e conseqüentemente a taxa de concepção/prenhez (Bridges e Day, 2006).

Seja por falha na resposta ao GnRH ou pela variação no início da nova onda nos tratamentos com E₂ associado P₄, pode-se ao final dos tratamentos induzir folículos de tamanho, maturidade, e capacidade esteroideogênica variáveis (Perry et. al., 2004; Vasconcelos, 1999, Day, 2005). O controle adequado do desenvolvimento folicular minimiza a ovulação de folículos imaturos ou persistentes e além disso influencia na porcentagem de animais efetivamente sincronizados.

Protocolos que utilizam GnRH, PGF2 α com ou sem a adição de progesterona

O primeiro protocolo de IATF desenvolvido para vacas de leite foi denominado "Ovsynch" (Pursley, 1995). Este tratamento utiliza GnRH e PGF2 α para sincronizar a ovulação. A primeira aplicação de GnRH tem o objetivo de sincronizar o desenvolvimento folicular, 7 dias após é administrada PGF2 α para induzir luteólise e 2 dias após GnRH para sincronizar ovulação com IATF 8 a 16 horas após o GnRH (Ovsynch). Posteriormente, foi feita uma modificação neste protocolo, que manteve a concepção e facilitou o manejo, com a IATF no momento da segunda aplicação de GnRH (Co-synch) (Geary et. al., 2001 vacas de corte: 58 vs 57%; Pursley et al., 1998, vacas de leite: 37 vs 45%).

Em novilhas, a taxa de concepção em protocolos com GnRH e PGF2 α são menores do que o ideal, de 38,9% para animais *Bos taurus* (revisado por Day, 2005a) e entre 21 e 43% em *Bos indicus* (revisado por Bó et. al., 2003). Dados da literatura sugerem que novilhas têm menor resposta ao primeiro GnRH do tratamento, por possuírem maior proporção 3 ondas foliculares, resultando em menor taxa de sincronização ao protocolo (menor resposta ao primeiro GnRH – 56%, Pursley et al, 1995).

A relação positiva entre a resposta ao primeiro GnRH e a taxa de prenhez foi relatada em vacas de leite (ovulação ao primeiro GnRH e taxa de prenhez - sim: 29,9%, 49/164 vs não: 19,3%, 34/176, Santos et al, 2003 e sim: 92%, não: 79%, Vasconcelos et al., 1999) e foi sugerido que, a não ovulação ao primeiro GnRH alterou a taxa de prenhez apenas por influenciar a taxa de sincronização

(87,2%, 143/164 63,4%, 112/176), não alterando a taxa de concepção dos animais efetivamente sincronizados (Santos et al, 2003).

Outro fator limitante destes protocolos é a alta incidência de estro antes da IATF, que pode ser um indicativo da baixa taxa de ovulação ao primeiro GnRH (estro antecipado – Williams et. al., 2002, 28,9%; Roy et. al., 1996, 17,3%). A inseminação das novilhas apresentando estro antes da segunda injeção de GnRH, aumentou as taxas de prenhez de 42,4 para 57,5% (Williams et. al., 2002).

Uma alternativa simples que visa prevenir ovulações antecipadas é a utilização de um dispositivo de P₄ durante o protocolo. Em novilhas cruzadas simental, o CIDR mantido entre o dia 0 e 7 do protocolo aumentou a taxa de prenhez a IATF de 39% (9/23) para 68% (17/25), e o aumento foi justificado pelos autores por provável maior taxa de sincronização (Martinez et. al, 2002a).

Um grande estudo foi realizado em 12 diferentes locais dos EUA comparando protocolos com GnRH, PGF2 α e CIDR para IATF e observação de estro + IATF em 2.077 novilhas de corte. Os resultados de prenhez foram: CIDR+ PGF2 α +OBS CIO+IATF (GnRH) 84h: 54,5%, GnRH + CIDR+ PGF2 α + OBS CIO + IATF (GnRH) 84h: 57,3%, CIDR+ PGF2 α + IATF (GnRH) 60h: 49,1% e GnRH + CIDR+ PGF2 α + IATF (GnRH) 60h: 53,1%. Os autores relataram que os resultados não diferiram estatisticamente, no entanto foram mais consistentes nas diversas localidades na abordagem GnRH+CIDR+PGF2 α +OBS CIO+ IATF (GnRH) 84h (Larson et. al., 2004).

A substituição do segundo GnRH (estímulo ovulatório) por BE com IATF 30 a 34 h após, não aumentou a taxa de prenhez em novilhas Nelore (33%, Barros et. al., 1998).

De acordo com os dados acima os protocolos que utilizam GnRH para controlar o desenvolvimento folicular, tem menor resultado em novilhas. O dispositivo intravaginal de P₄ (CIDR) é uma ferramenta interessante para aumentar o sucesso destes protocolos e a observação de cio por curto período de tempo aliada a estes tratamentos tornou os resultados mais consistentes.

Protocolos que utilizam estradiol e progesterona

Foi demonstrado que o estradiol é eficiente em sincronizar a onda folicular (Burke, 1996 e Burke, 2001) e a ovulação (Bó et. al., 1994) quando administrado em associação com progesterona/progestágenos.

A substituição do GnRH para controle folicular e/ou estímulo ovulatório pelo estradiol em programas com CIDR foi avaliada. Foi relatada maior taxa de estro e prenhez em novilhas que receberam benzoato de estradiol para sincronizar a onda e a ovulação (estro 100%, 41/41, prenhez 76%, 31/41) quando comparadas a novilhas que receberam GnRH (estro 55%, 23/42, prenhez 48%, 20/42) e ao controle (CIDR + PGF_{2α} - estro 83%, 35/42, prenhez 38%, 16/38, Martinez et al., 2000). Com a utilização de cipionato de estradiol (ECP; estudo com 1906 novilhas), maiores taxas de prenhez (IATF + Touro) foram relatadas em novilhas de corte tratadas com CIDR 9 dias e com ECP na sincronização de onda e ovulação (24h pós CIDR) (9 d – 84,6%) e com o Protocolo Co-synch com a PGF_{2α} administrada nos dias 6 ou 7 (d7: 89,0% e d6: 87,7%) quando comparadas a novilhas sincronizadas com CIDR por 7 d e ECP na sincronização de onda e ovulação (24h pós CIDR); Stutts et. al., 2004). No entanto quando avaliada a taxa de concepção a IATF todos os tratamentos diferiram entre si (CIDR (9 d) + ECP: 32,4%, CIDR (7d) + ECP: 19,6%, Cosynch e PGF d 7: 43,2% e Cosynch + PGF_{2α} d 6: 50,4%), sendo que a maior taxa concepção foi no grupo Cosynch + PGF_{2α} d 6 (Stutts et. al., 2004). Outro estudo (979 novilhas) relatou taxas de prenhez similares para novilhas tratadas com Co-synch + CIDR (56%) e ECP + CIDR 7 d + PGF_{2α} + ECP (57%), além de melhor taxa de prenhez quando o ECP foi utilizado como estímulo ovulatório 24 h após a retirada do CIDR (ECP 0h-52%, ECP 24h-65% e Co-synch-51%, Colazo et. al., 2002), ou seja, quando o período entre a retirada do dispositivo de P₄ e a estímulo ovulatório foi maior (ou seja maior tempo de proestro), a taxa de prenhez aumentou.

Outra alternativa utilizada em protocolos com CIDR e BE para aumentar a taxa de prenhez a IATF foi a utilização de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da retirada do dispositivo de P₄. Marques et. al, 2005, relataram maiores

taxas de prenhez quando o eCG foi incorporado a um protocolo com CIDR e BE (sem eCG:15,7%, 31/197, com eCG: 34,9%, 68/195) em novilhas *Bos indicus*. Ainda assim a taxa de prenhez foi baixa quando comparada a programas que utilizam observação de estro, mas neste estudo não foram relatadas as taxas de concepção.

Quanto a reutilização de dispositivo intravaginal de P₄, foi relatada maior taxa de prenhez para o dispositivo intravaginal de P₄, DIV-B[®] (1,0 g de P₄, Syntex), previamente utilizado, quando comparado ao mesmo dispositivo sem utilização prévia (59,7%, 114/191 vs 49,5%, 99/200) em vacas cruzadas *Bos indicus* X *Bos taurus* (apud Bó et al., 2003). Embora o diâmetro do FD não tenha sido avaliado neste experimento, os autores sugeriram que, o ambiente de menor concentração de progesterona e conseqüentemente maior pulsatilidade de LH, pode ter influenciado positivamente o diâmetro folicular. O diâmetro folicular pode atuar no aumento da capacidade ovulatória (Burke et al., 2001) e no diâmetro do CL subsequente aumentando a concentração sérica de P₄ (Vasconcelos et al, 1999) e conseqüentemente a fertilidade. Mantovani et al., 2005, encontraram que maiores concentrações plasmáticas de progesterona, advindas de dispositivos sem utilização prévia quando comparados a dispositivos usados, promoveram redução do diâmetro folicular e tendência a redução da taxa ovulatória.

Em contraste, Colazo et al. (2004), observaram menor taxa de prenhez em novilhas sincronizadas com dispositivo intravaginal de P₄ (CIDR[®]) previamente utilizado por 14 dias, quando comparado ao mesmo dispositivo previamente utilizado por 7 dias em gado cruzado ($P < 0,3$; 48,4%, 88/182 vs 62,%, 113/181). No entanto, a ciclicidade não foi avaliada e no caso da presença de CL, a concentração de progesterona pode não ter diferido entre os grupos. A razão da menor taxa de prenhez não foi discutida

Outro protocolo utilizado tem como base um progestágeno, o norgestomet (3 mg, Crestar ou 6 mg, Syncromate-B-Merial[®]), aplicado na forma de um implante auricular subcutâneo de silicone (Crestar[®], Intervet), colocado no animal por um período de 9 dias. No momento da inserção uma injeção de 5 mg de valerato de estradiol (VE) mais 3 mg de norgestomet é administrada. Vacas e novilhas são

inseminadas 12 h após a observação de estro ou IATF 48 h em novilhas e 56 h em vacas após a remoção do implante (Bó et. al., 2003).

Os resultados em novilhas *Bos indicus* são bastante variáveis. Na utilização deste protocolo em novilhas cruzadas Brahman, 25% destas falharam em demonstrar estro até 48 h após a retirada do implante ou em promover a onda pré-ovulatória de LH até 12 h após o início do estro, levando a estro sem ovulação e baixas taxas de concepção (Mikeska e Williams, 1998). Foi sugerido que, a baixa fertilidade relacionada a este programa pode estar relacionada a concentrações excessivamente altas de estradiol, promovidas pela administração de VE durante o tratamento e antes da ovulação, que possivelmente atrasou o momento do início da nova onda folicular (Cavalieri et. al., 1997). O estradiol em altas concentrações poderia induzir supressão prolongada do crescimento folicular (Bó et. al., 1993).

Em outro experimento foi relatada maior taxa de prenhez em novilhas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus*, inseminadas em tempo fixo (54 h) quando a injeção inicial de VE + P₄ foi substituída por uma aplicação de BE, que tem menor período de ação (BE + P₄: 38,9% (37/95) vs VE + P₄: 29,9% (25/93), P < 0,06, apud, Bó et al., 2003).

Quando o eCG foi adicionado ao protocolo Crestar (com BE) no momento da retirada do implante, com o objetivo de estimular o crescimento folicular observou-se aumento da taxa de sincronização (s/ eCG: 67,8%, 59/87 vs com eCG: 86,7%, 78/90), promovendo aumento da taxa de prenhez (s/ eCG: 36,8%, 32/87 vs com eCG: 50%, 45/90), sem alterar a concepção dos animais efetivamente sincronizados (s/ eCG: 54,2%, 32/59 vs com eCG: 57,7%, 45/78; Sá Filho et. al., 2005). Os efeitos do eCG foram relacionados a provável maior sincronia do estro, ovulação e onda pré-ovulatória de LH (Sá Filho et. al., 2005, Cavalieri, 1997).

Efeito da maturidade folicular na taxa de concepção em protocolos de IATF

No desenvolvimento de protocolos, existe preocupação em evitar a indução da ovulação de folículos imaturos ou persistentes.

Para estudar a influência da ovulação de folículos imaturos, (Mussard et. al., 2002, 2003 e Bridges et. al., 2004), foi desenvolvido um modelo que controla a idade, tamanho e duração do proestro (intervalo da regressão do CL até o pico de LH). Ao induzir a ovulação de um folículo imaturo de 10 mm e de menor idade quando comparado ao de animais que ovularam espontaneamente, foram observadas menor taxa de concepção (folículos de 10 mm: 75,9% (22/29) ovulação espontânea: 100% (24/24)) e menor concentração de progesterona (d 12) no ciclo subsequente (folículos de 10 mm: $5,4 \pm 0,2$ e ovulação espontânea: $6,2 \pm 0,3$, Mussard et. al., 2002). Concluiu-se que a taxa de concepção e a função lútea estão comprometidas quando a ovulação de folículos imaturos é induzida.

A relação entre o diâmetro folicular e a concepção também foi relatada por Perry et. al. (2004), que observaram efeito quadrático do diâmetro do FD na concepção, sendo que a variação de diâmetro considerada ótima foi de 11,5 a 16 mm. No protocolo utilizado (Co-synch), a indução de ovulação de folículos menores foi o maior problema. Quarenta e sete por cento dos animais ovulados tinham folículos pequenos e 3% tinham folículos maiores.

Ao comparar a função lútea e a taxa de concepção de folículos grandes e maduros (13 mm) e folículos pequenos e imaturos (10 mm), ambos induzidos a ovular com GnRH, observou-se menor taxa de concepção (4,4% (2/45) vs 57,4% (31/54) e concentrações de progesterona na fase lútea média reduzidas nas novilhas do grupo GnRH10 ($4,9 \pm 0,2$ vs $5,5 \pm 0,2$ ng/ml). A modificação do momento da injeção de GnRH, resultou em diminuição do folículo ovulatório ($11,2 \pm 0,2$ vs $13,6 \pm 0,2$ mm), idade do folículo dominante ($5,4 \pm 0,1$ vs $6,6 \pm 0,1$ dias) e da duração do proestro ($1,0 \pm 0,1$ vs $2,2 \pm 0,1$ dias) para folículos induzidos a ovular com 10 mm comparados a folículos de 13 mm (Mussard et. al, 2003).

O momento da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, pode alterar o diâmetro folicular no momento da indução da ovulação nos protocolos de IATF e parece ter influência importante nos resultados em novilhas. Sá Filho et. al. (2003), relataram que em um lote de novilhas cruzadas *Bos indicus* x *Bos taurus* com provável alta porcentagem de animais ciclando, quando a injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi antecipada para o dia 7, no protocolo BE + CIDR (9 d) + PGF (d7 ou 9) + BE as novilhas

tenderam a apresentar maior taxa de concepção, quando comparadas a novilhas que receberam PGF2 α no dia 9, momento da retirada do CIDR (d7: 64%, 11/17) vs d9: 39,9% (7/18). Os autores sugeriram que, após a luteólise, a P₄ subluteal proveniente do CIDR[®], permitiu o aumento da pulsatilidade de LH, levando ao provável aumento no diâmetro do folículo dominante, e subsequente CL, o que não aconteceu nos animais do grupo que receberam PGF2 α no dia 9 e mantiveram o CL até o momento da retirada do CIDR[®], havendo assim mudanças na taxa de concepção relativas ao folículo dominante induzido a ovular.

Nos experimentos citados acima o diâmetro do folículo ovulatório influenciou consideravelmente a concepção subsequente, no entanto, outras variáveis foliculares também foram modificadas, como, a idade do folículo, e a duração do proestro (intervalo entre a injeção de PGF2 α e a de GnRH). Ao avaliar os resultados em conjunto, Day (2005b) e Day and Bridges (2006) relataram que, a taxa de concepção parece estar mais estreitamente relacionada à duração do proestro do folículo ovulatório do que propriamente do diâmetro do mesmo (Tabela 2).

Para avaliar a taxa de concepção de folículos com diâmetro constante e variação de tempo de proestro, desenvolveu-se um modelo experimental. Sincronizou-se o estro e aspirou-se os folículos para reinício de onda folicular (6 d), em seguida, as novilhas foram divididas em dois grupos, os que receberam PGF2 α 4,5 (n=40) ou 5,5 dias (n=38) após a aspiração folicular e todas receberam GnRH 6,75 dias após a aspiração sendo inseminados após 12 horas, tendo assim proestro longo (PL), de 2,25 dias e curto (PC) de 1,25 dias. O diâmetro folicular foi similar entre os grupos (PC: 12,9 \pm 0,2 vs PL: 12,6 \pm 0,2 mm). No grupo PC foi maior a incidência de ciclos estrais curtos (74% vs 30%). No entanto para os animais com ciclos estrais de duração normal a taxa de concepção (PC: 10%, 1/10 vs PL: 70%, 20/28) e a concentração sérica de progesterona no dia 12 do ciclo subsequente foram menores (PC: 2,8 \pm 0,4 vs PL: 4,3 \pm 0,4 ng/ml). Estes resultados confirmaram que independentemente do diâmetro folicular, quando a duração do proestro foi reduzida, a taxa de concepção e a concentração sérica de P₄ no ciclo subsequente diminuíram (Day, 2005b).

Quanto a relação entre a ovulação de folículos imaturos e o ambiente uterino, Sá Filho et. al, 2004 relataram tendência a maior taxa de concepção em animais que receberam embriões em tempo fixo (TETF) sincronizados com CIDR + BE, PGF2 α e BE, para o grupo que recebeu PGF2 α dia 7 (PGF2 α d7: 35%, 29/83 do que o que recebeu PGF d9: 20%, 14/70, P = 0,12) e maior concentração de progesterona no dia 7 pós-ovulação para o mesmo grupo (PGF2 α d7: 2,78 \pm 0,24 vs PGF d9: 2,15 \pm 0,24 ng/ml, P = 0,06), sem alterar o diâmetro do folículo ovulatório, a taxa de sincronização e o diâmetro do CL subsequente.

Foi relatada menor taxa de prenhez (8,3%, 1/12 vs 66,7%, 8/12), tempo entre o início do tratamento a ovulação (6,8 \pm 0,1 vs 7,8 \pm 0,2 dias), diâmetro folicular (11,1 \pm 0,2 vs 13,7 \pm 0,2 mm) e concentração sérica de P₄ no dia 12 do ciclo subsequente (3,4 \pm 0,4 vs 5,6 \pm 0,3 ng/ml) para o grupo em que folículos de 10 mm quando comparado a folículos de 13 mm induzidos a ovular com GnRH (apud Day, 2005b). Os autores sugeriram que a indução prematura da ovulação pode interferir na sequência normal das alterações pré-ovulatórias de estradiol e gonadotropinas, sendo possível que esta interrupção altere o ambiente uterino no suporte adequado a gestação, e a competência do oócito, fertilização ou mortalidade embrionária precoce, relacionadas à proveniência oocitária, podem não ter sido o mecanismo principal responsável pela redução na fertilidade associada com a ovulação de pequenos folículos ovarianos (apud Day, 2005b).

TABELA 2: Resumo dos resultados de 4 experimentos realizados em novilhas *Bos taurus*. A taxa de concepção incluiu apenas animais que tiveram ciclo estral subsequente ao tratamento de duração normal. Experimentos (Exp) 1: Mussard et al. (2002); Exp 2: Mussard et al. (2003); Exp 3: Mussard et al. (2003). Exp 4: apud Day (2005b) (adaptado de Day, 2005b).

Tratamento	Exp	Taxa de Concepção (%) (n)	Duração Proestro (dias)	Ø FD (mm)	Idade FD (dias)	[P ₄ d ₁₂] pós-ovulação (ng/ml)
GnRH 10	2 IA	4,4 (2/45)	1,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	5,4	4,9 ± 0,2
GnRH 10	3 TE	8,3 (1/12)	1,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	5,1	3,4 ± 0,4
GnRH PEC	4 IA	10 (1/10)	1,25	12,6 ± 0,2	5,25	2,8 ± 0,4
GnRH 13	2 IA	57,4 (31/54)	2,2 ± 0,1	13,6 ± 0,2	6,6	5,5 ± 0,2
GnRH 13	3 TE	66,7 (8/12)	2,0 ± 0,1	13,7 ± 0,2	6,1	5,6 ± 0,3
GnRH PEL	4 IA	71 (20/28)	2,25	12,9 ± 0,2	5,25	4,3 ± 0,4
GnRH 10	1 IA	75,9 (22/29)	3,3 ± 0,1	10,7 ± 0,1	5,1	5,4 ± 0,2
ESPONTÂNEA	1 IA	100 (24/24)	4,7 ± 0,3	12,0 ± 0,3	6,0	6,2 ± 0,3

Na tentativa de caracterizar quais seriam as alterações hormonais responsáveis pela diferença observada na fertilidade, Bridges et al. (2004) avaliaram o estradiol pré-ovulatório, a amplitude e duração do pico de LH induzido pelo GnRH, e as concentrações de progesterona circulantes no ciclo estral subsequente. O pico de LH foi similar entre os tratamentos. A incidência de ciclos curtos tendeu a ser maior e as concentrações de progesterona no ciclo estral subsequente tenderam a ser menores no tratamento de proestro curto vs longo. O estradiol no período pré-ovulatório foi maior quando o proestro foi longo, durante as 32 horas que antecederam a administração de GnRH. Ao avaliarem a taxa de concepção de acordo com o estradiol pré-ovulatório independente do tratamento os autores encontraram concepção de 88,9% para animais com estradiol > 10 pg/ml e 14,3% para animais com estradiol < 10 pg/ml.

De acordo com a literatura citada (Mussard et. al., 2002, 2003 e Bridges et. al., 2004, Day, 2005b e Day e Bridges, 2006) a concepção está mais relacionada a capacidade esteroidogênica do folículo dominante durante o proestro e do CL resultante, influenciados positivamente pela maior duração do proestro, do que do diâmetro ou idade do folículo no momento do pico de LH. Além disso, tendo em vista os resultados do experimento que utilizou a transferência de embriões, sugeriu-se que as alterações produzidas pela ovulação de folículos imaturos (diminuição do estradiol pré-ovulatório e da progesterona na fase lútea média), interferem na habilidade do útero em sustentar o embrião (alterando o ambiente uterino), mais do que na incompetência do oócito ou mesmo falha de fertilização. O ambiente uterino alterado poderia gerar falhas gestacionais diretamente por não proporcionar um ambiente adequado para o embrião, levando a sua morte, ou indiretamente, por não dar o suporte adequado ao crescimento embrionário, que poderia levar a diminuição do tamanho do conceito e consequente falha no processo de reconhecimento materno da gestação.

O estradiol pré ovulatório altera a morfologia do endométrio, como o crescimento e desenvolvimento de células epiteliais glandulares e da luz do endométrio, e a relação destas com a secreção de proteínas uterinas (Murray, 1992 e Johnson et al., 1997), e a responsividade uterina a outros sinais endócrinos como a regulação da expressão de receptores de estradiol (relação com duração do CL, Lamming e Mann, 1995, Bridges et al., 2004) e progesterona no útero (relação com secreções endometriais glandulares adequadas e sobrevivência embrionária) (Kimms e MacLaren, 2004, Robinson et al., 2001, Ing e Zhang, 2004), e aumento do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) no útero (Robinson et al., 2001) e oviduto (Pushpakumara et al., 2002), relacionado com o desenvolvimento embrionário e a fertilização (revisado por Day, 2006).

Em ovelhas ovariectomizadas, quando foram omitidas concentrações de estradiol similares às presentes no estro, não foram recuperados embriões normais e a síntese uterina de proteína foi reduzida (Miller e Moore, 1976a e b).

Os dados citados acima demonstraram uma relação positiva entre as concentrações de progesterona na fase lútea média e concepção (Mussard et. al., 2002, 2003 e Bridges et. al., 2004).

O IFN τ é o principal sinal liberado pelo embrião para o reconhecimento materno da gestação (Godkin et al, 1982, Farin et al., 1990) e a capacidade de produção de IFN τ está diretamente relacionado ao tamanho do embrião (Mann e Lamming, 1999). Para o desenvolvimento do embrião, o histotrófo tem grande importância pois é a única fonte de nutrição antes da placentação (Geisert et al., 1988), que ocorre apenas em torno do dia 27 da gestação (King et al, 1980). A suplementação com progesterona aumentou o tamanho e desenvolvimento morfológico do conceito, a produção de IFN τ e a secreção de proteínas uterinas (Garret et al., 1988), sendo portanto relacionada ao reconhecimento materno da gestação (revisado por Day, 2006).

Desta maneira o estradiol programa o útero para o adequado desenvolvimento do conceito e a progesterona coordena e controla a função uterina para manutenção da gestação.

Quanto a indução da ovulação de folículos persistentes, são produzidos quando da administração de progestina em níveis subluteais para inibir o estro e a ovulação, se desenvolvendo quando estes tratamentos prolongam o ciclo estral e são secretores de estradiol (concentrações plasmáticas elevadas; Sirous e Fortune, 1990).

As causas da baixa fertilidade destes folículos, parecem estar relacionadas ao desenvolvimento anormal de embriões (Ahmad et. al., 1995), devido a maturação precoce dos oócitos (Mihm et. al., 1994, Revah e Buttler, 1996) e/ou a alteração do ambiente do oviduto (Binelli et. al., 1999) e do útero (Mantovani et. al., 2005).

Em oócitos provenientes dos folículos persistentes, foi observada a retomada prematura da meiose (Mihm et. al., 1994), evidenciada pela antecipação da quebra da vesícula germinativa (Revah e Buttler, 1996).

Embriões, provenientes de oócitos de FP apresentam atraso de desenvolvimento em relação a embriões de oócitos de folículos normais [FN

(Taxas de clivagem - FP: 43% 2 a 8 células, 43% 9 a 15 células vs FN: 86% \geq 16 células; Ahmad et. al., 1995)] , o que pode comprometer a taxa de concepção, que é baixa para embriões provenientes de folículos persistentes.

Quanto a causas relacionadas ao útero para explicar a baixa fertilidade de fêmeas que ovulam folículos persistentes, os resultados são controversos. Mantovani et. al., 2005 encontraram menores taxas de concepção (38,9 e 37,1% nos grupos com FP vs 59,1% no grupo controle) em animais que receberam embriões (TE) 7 dias após a ovulação e sugeriram que pode ter sido induzida regressão prematura do corpo lúteo. No entanto, Wehrman et. al, 1997 não observaram diferenças na taxa de concepção a TE de animais que ovularam folículos persistentes (submetidos a alta concentração de E₂), sugerindo que as causas da baixa fertilidade advinham do oócito, ou do ambiente do oviduto ou mesmo uterino antes do dia 7 (Taxa de concepção: alto E₂ (FP) :31,1% vs baixo E₂: 36,2% e controle: 33,3%).

3. MATERIAL E MÉTODO

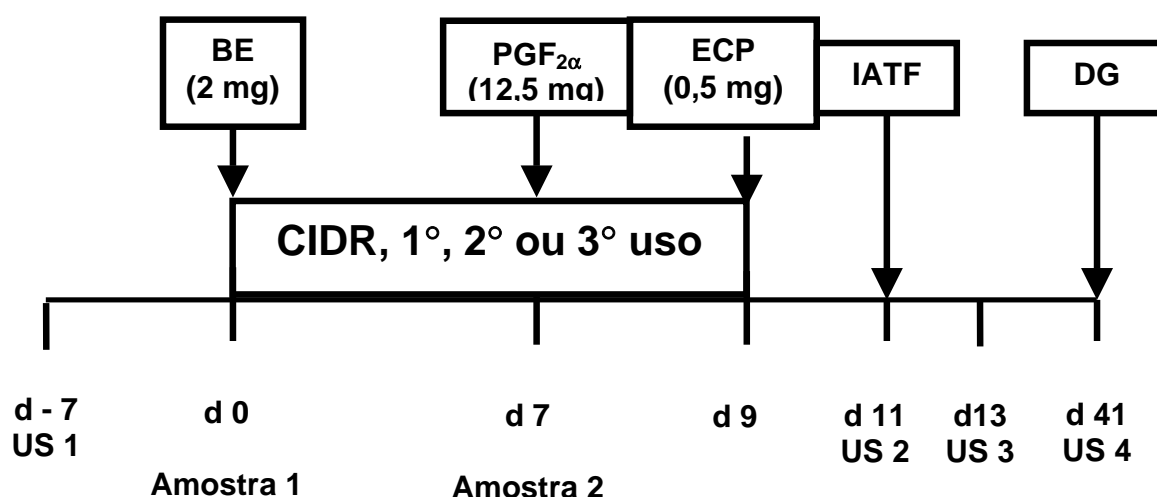
Local experimental e animais e tratamentos

Foram utilizadas 398 novilhas ciclando, com escore de condição corporal de $3,1 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5, Lowman et al., 1976), pertencentes a Fazenda Novo Horizonte, situada no município de Coxim-MS. As novilhas foram mantidas a pasto (*Brachiaria humidicola*) e sal mineral à vontade, divididas em dois lotes.

Foram consideradas ciclando e mantidas no experimento as novilhas que possuíam um CL visível ao exame de ultrassom (US1) 7 dias antes do início do tratamento (dia -7). Todos os animais foram sincronizados utilizando-se o seguinte protocolo: dia 0, administração de BE (2 mg, i.m., Estrogin[®], Farmavet, Brasil) e inserção de um dispositivo intravaginal de P₄ (CIDR[®], 1,9 g, Pfizer Saúde Animal, Brasil), dia 7, aplicação de prostaglandina F₂ α (12,5 mg, i.m., Lutalyse[®] - Pfizer Saúde Animal, Brasil), dia 9, retirada do dispositivo de P₄ e aplicação de ECP (0,5 mg, i.m., ECP[®] - Pfizer Saúde Animal, Brasil). As novilhas foram divididas

aleatóreamente para receber dispositivos de P₄ sem utilização prévia (1° uso), utilizados previamente por 9 dias (2° uso) ou por 18 dias (3° uso). A IATF foi realizada 48 h após a retirada do dispositivo de P₄. Utilizou-se partidas de sêmen de um mesmo touro em todas as novilhas. No momento da IATF foi avaliado por US (US 2) o diâmetro do maior folículo (\emptyset Fol) através da média dos diâmetros horizontal e vertical. As novilhas que apresentaram ovários característicos de reinício de crescimento folicular (diversos folículos de diâmetro ≤ 6 mm) neste momento foram consideradas ovuladas antecipadamente. No dia 13 foi avaliada por US (US 3) a ovulação dos animais e foram considerados ovuladas as novilhas que apresentaram ovários característicos de reinício de crescimento folicular (diversos folículos de diâmetro ≤ 6 mm) no dia 11 e novilhas cujos \emptyset Fol mensurados no dia 11 não estavam presentes na avaliação do dia 13. Foram consideradas efetivamente sincronizadas apenas as novilhas cujos folículos mensurados no dia 11 não estavam presentes na avaliação do dia 13. O diagnóstico de gestação foi avaliado por ultrassonografia (US 4) 30 dias após a IATF.

Esquemática do Protocolo:



Exames Ultra-sonográficos

Os exames de US foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500, com transdutor linear de 7,5 MHz, para avaliar a presença de CL das novilhas (US 1), o diâmetro do maior folículo (US 2), a taxa de ovulação/sincronização (US 3) e o diagnóstico de gestação (US 4).

Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona

As amostras de sangue foram colhidas nos dias 0, antes da inserção do dispositivo intravaginal de P_4 , e 7 para dosagem de P_4 , na veia coccígea em tuBos com vácuo sem anticoagulante (Vacutainer®). Após a colheita, o sangue foi imediatamente colocado em gelo na posição vertical e até completar 24 h, mantido em refrigerador a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 1500 X g por 15 minutos a temperatura ambiente, para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas em freezer a em torno de -20°C até a realização das dosagens.

As amostras de P_4 no dia 0 e no dia 7 foram utilizadas para avaliar a influência da concentração de P_4 nas taxas de ovulação, sincronização, concepção dos animais efetivamente sincronizados e prenhez.

Dosagem da progesterona sérica

As concentrações de progesterona séricas foram determinadas nas amostras de soro com o Kit de radioimunoensaio em fase sólida (Coat-a-count® - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA).

Alíquotas de 100µl de soro ou de diluições da curva padrão foram incubadas por três horas em temperatura ambiente (15 a 28°C) com 1 mL de P_4 marcada [I-125] em tuBos com anticorpo contra P_4 aderido à parede. Após a incubação, foi removido todo o líquido dos tuBos, e cada tubo foi contado por um minuto em contador gama.

As amostras foram processadas em dois ensaios, sendo processadas as amostras de cada dia de coleta separadamente (ensaio 1 = amostras de P₄ dia 0 e ensaio 2 = amostras de P₄ dia 7). A sensibilidade dos ensaios foi de 0,1 ng/ml. O coeficiente de variação (CV) intraensaio foi 6,7% para o ensaio 1 e 8,5% para o ensaio 2 e o CV interensaio foi 5,4%.

Análise Estatística

As variáveis dependentes contínuas foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos, utilizando-se o procedimento GLM do programa SAS. Para cada variável os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Kolmogorov-Smirnov) e quanto à homogeneidade das variâncias (Teste Brow-Forsythe). A concentração plasmática de P₄ não obedeceu às premissas para a análise de variância e sofreu transformação por log₁₀. As demais variáveis dependentes não sofreram transformação.

Para a análise da variável dependente máximo diâmetro folicular a IATF, foi incluído no modelo o efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄, da concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7 do protocolo (como covariáveis), do ECC e das interações entre tratamento e concentração sérica de progesterona nos dias 0 e 7 do protocolo. A comparação das médias dos quadrados mínimos desta variável dentro dos tratamentos foi feita através do teste de Tukey-Kramer.

A variável dependente concentração de progesterona no dia 7 foi analisada após transformação logarítmica e foi incluído no modelo o efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄. A comparação das médias dos quadrados mínimos desta variável dentro dos tratamentos foi feita através do teste de Tukey-Kramer

As variáveis dependentes binomiais foram analisadas utilizando-se o procedimento LOGISTIC do programa SAS. A comparação das médias ajustadas para efeito de classes foi realizada pelo método de Bom-Ferroni.

Para a análise da variável taxa de ovulação (ou seja, todas as novilhas que ovularam) foram incluídos no modelo o efeito do número de utilizações do

dispositivo intravaginal de P₄, da concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7 do protocolo (covariáveis), do ECC (covariável) e das interações entre os tratamentos e a concentração de P₄ nos dias 0 e 7.

Para a análise da variável taxa de sincronização (ou seja, das novilhas que ovularam entre a IATF e 48h após) foram incluídos no modelo o efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄, da concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7 do protocolo (covariáveis), máximo diâmetro folicular a IATF (covariável), do ECC (covariável) e das interações entre os tratamentos e a concentração de P₄ nos dias 0 e 7.

Para a análise da variável taxa de concepção (novilhas efetivamente sincronizadas, ou seja, que ovularam em até 48h após o momento da IATF) foram incluídos no modelo o efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄, do inseminador, da concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7 do protocolo (covariáveis), do máximo diâmetro folicular a IATF (covariável), do ECC foram incluídos (covariável) e das interações entre o tratamento e a concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7.

Quando observado efeito do máximo diâmetro folicular a IATF, este foi dividido em 3 classes (Classe 1 : menores do que 8,5 mm; Classe 2: entre 8,5 e 10,0 mm; Classe 3: maiores do que 10,0 mm) previamente definidas por Gimenes et al. (2007) em novilhas Nelore e o efeito da classe folicular foi avaliado com comparação das médias de cada classe feita pelo método de Bom-Ferroni. No entanto, a classe de folículos menores do que 8,5 mm nas novilhas sincronizadas com dispositivo intravaginal de P₄ de 2º uso foi 0%. Assim, para a comparação das médias das classes foliculares neste grupo de novilhas foi utilizado o teste exato de Fisher pelo procedimento FREQ do programa SAS.

Para a análise da variável taxa de prenhez foram incluídos no modelo o efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄, o inseminador, da concentração sérica de P₄ nos dias 0 e 7 do protocolo (covariáveis), do ECC (covariável) e das interações entre o tratamento e a concentração de P₄ nos dias 0 e 7.

Foram considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0,05$ e tendências valores de $P < 0,1$.

Em todas as análises quando não foi observado efeito da interação e/ou covariável, estes foram retirados do modelo.

4. RESULTADOS

Concentração de Progesterona no dia 7

A concentração de progesterona no dia 7 foi influenciada pelo número de utilizações do CIDR e foi maior ($P < 0,05$) no 1º uso ($2,4 \pm 1,1$ ng/ml) do que no 2º uso ($2,0 \pm 1,0$ ng/ml) e no 3º uso ($1,7 \pm 1,1$ ng/ml) e o 2º tendeu a ser maior que o 3º uso ($P < 0,1$).

Máximo diâmetro folicular a IATF

O máximo diâmetro folicular a IATF foi influenciado pela concentração sérica de P_4 no início do protocolo de forma positiva ($P < 0,05$, Figura 1), e pelo número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 . O efeito detectado do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 revelou que as novilhas tratadas com dispositivos de 1º uso apresentaram folículos menores ($10,0 \pm 0,19$ mm, $n = 121$) quando comparados aos animais tratados com dispositivos de 3º uso ($11,0 \pm 0,21$ mm, $n = 109$) e os folículos das novilhas tratadas com dispositivos de 2º uso ($10,6 \pm 0,20$ mm, $n = 106$) não diferiram dos demais.

Não foi detectado efeito da concentração sérica de P_4 no dia 7, do escore de condição corporal e da interação entre número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 e concentrações séricas de progesterona no dia 0 e dia 7.

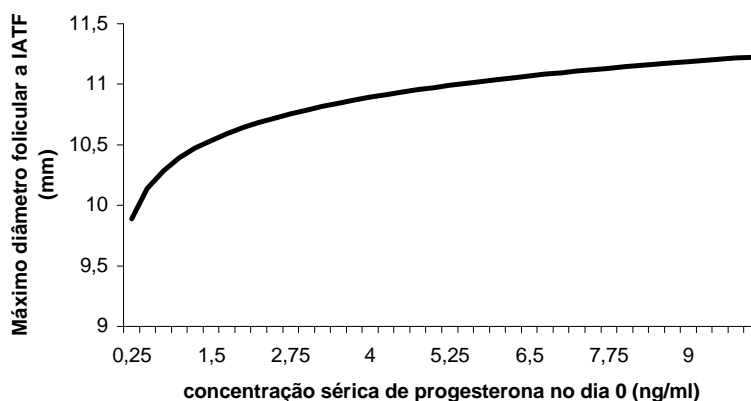


FIGURA 1: Máximo diâmetro folicular a IATF de acordo com a concentração de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

Taxa de Ovulação

Não foi detectado efeito das variáveis avaliadas na taxa de ovulação que foi 73,6% (1º uso: 70,5%, 103/146, 2º uso: 72,7%, 93/128, e 3º uso: 78,2%, 97/124). Nestas porcentagens estão incluídas 15,6% das novilhas tratadas que anteciparam a ovulação (62/398) e apresentaram taxa de prenhez de 6,4% (4/62). A taxa de prenhez das novilhas que ovularam entre o momento da IATF e 48 h após foi 29,5% (99/336).

Taxa de Sincronização

A taxa de sincronização das novilhas efetivamente sincronizadas (ou seja, que ovularam a partir do momento da IATF até 48 h após), foi de 68,7% (231/336). Foi detectada influencia linear positiva ($P < 0,05$) e tendência de influência quadrática ($P < 0,1$) do Máximo diâmetro folicular a IATF (Figura 2) na taxa de sincronização.

Na taxa de sincronização, não foi detectado efeito do número de utilizações do dispositivo de P₄ (1º uso: 64,5%, 78/121, 2º uso: 67,9%, 74/109 e 3º uso:

74,5%, 79/106), das concentrações séricas de P_4 nos dias 0 e 7 do protocolo de sincronização da ovulação, nem da interação destas com o número de utilizações do dispositivo de P_4 .

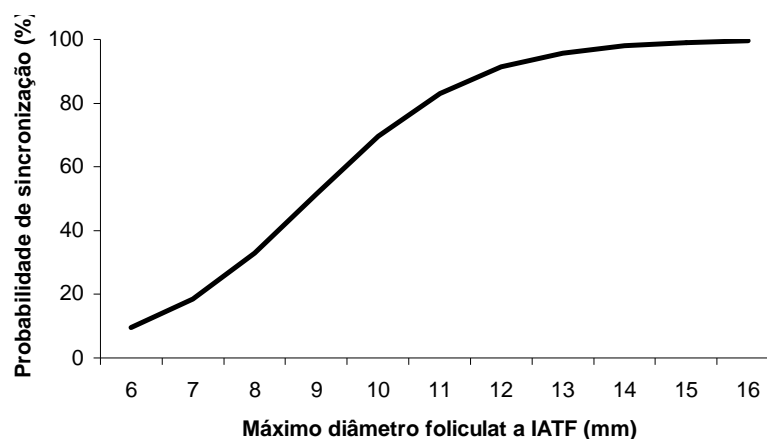


FIGURA 2: Probabilidade de sincronização de acordo com o máximo diâmetro folicular a IATF do protocolo de sincronização da ovulação ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

A classe do máximo diâmetro folicular a IATF influenciou a taxa de sincronização (Tabela 3).

Taxa de Concepção

A taxa de concepção das novilhas sincronizadas, tendeu a ser influenciada pelo número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 ($P < 0,1$) e pela concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação de forma positiva (Figura 3, $P < 0,1$), foi influenciada de forma linear positiva e tendeu a ser influenciada de forma quadrática pelo máximo diâmetro folicular a IATF (Figura 4, $P < 0,05$).

O efeito detectado do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 ($P < 0,1$) revelou que as novilhas tratadas com dispositivos de 1º uso (37,2%, 29/78) e de 2º uso (37,8%, 28/74) tenderam ($P < 0,1$) a apresentar menor taxa de

concepção quando comparadas as novilhas que receberam dispositivos de 3º uso (53,2%, 42/79).

Não foi detectado efeito da concentração sérica de progesterona no dia 7 do protocolo de sincronização, do escore de condição corporal e das interações entre o número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄ e as concentrações séricas de progesterona no dia 0 e dia 7.

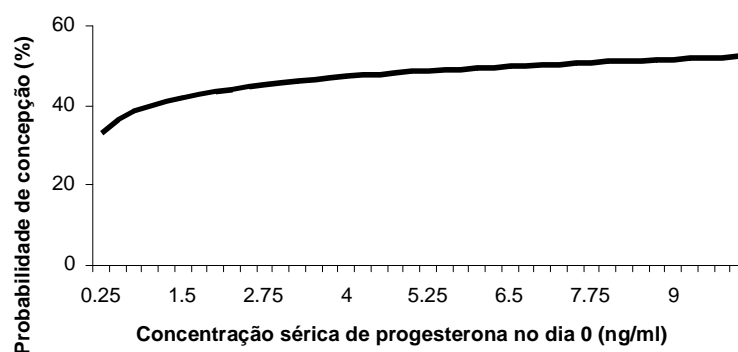


FIGURA 3: Probabilidade de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o a concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação. ($P < 0,1$). Botucatu - SP, 2007.

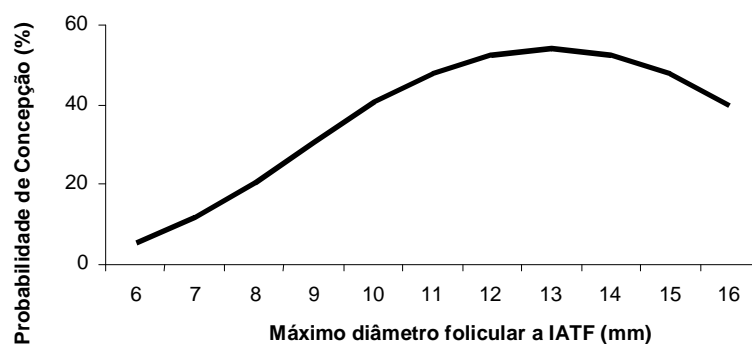


FIGURA 4: Taxa de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o máximo diâmetro folicular a IATF. ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

A classe do máximo diâmetro folicular a IATF também influenciou a taxa de concepção (Tabela 2).

TABELA 2: Taxa de sincronização e concepção das novilhas tratadas com protocolo de sincronização da ovulação de acordo com a classe de diâmetro folicular no momento da IATF. Botucatu - SP, 2007.

Classe do máximo diâmetro folicular a IATF	Classe 1 < 8,5 mm	Classe 2 8,5mm a 10,0mm	Classe 3 > 10,0 mm	Valores de P Contrastes
Taxa de Sincronização (%)	28,2 (20/71)	62,5 (70/112)	92,2 (141/153)	1: < 0,0001 2: < 0,0001
Média Ø Fol (mm)	7,7	9,6	12,6	3: < 0,0001
Taxa de Concepção (%)	15,0 (3/20)	32,9 (23/70)	51,8 (73/141)	1: < 0,168 2: < 0,015
Média Ø Fol (mm)	7,7	9,7	12,7	3: < 0,033

Classe do máximo diâmetro folicular = classe do maior diâmetro folicular no momento da IATF de acordo com o diâmetro.

Média Ø Fol = média do diâmetro folicular referente a cada classe folicular

Contraste 1: Classe 1 vs Classe 2; Contraste 2: Classe 1 vs Classe 3; Contraste 3: Classe 2 vs Classe 3.

As mesmas classes foliculares foram analisadas separadamente em cada tratamento, 1º, 2º e 3º usos do dispositivo intravaginal de P₄, e influenciaram a taxa de concepção (Tabela 4).

TABELA 3: Taxa de concepção das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com a classe de diâmetro folicular no momento da IATF por número de utilizações do CIDR. Botucatu - SP, 2007.

Concepção nos usos do CIDR	Classe 1 < 8,5 mm	Classe 2 8,5mm a 10,0mm	Classe 3 > 10,0 mm	Valores de P Contrastes
1º uso (%)	9,1 (1/11)	24,0 (6/25)	52,4 (22/42)	1: 0,1834 2: 0,0181 3: 0,0485
Média Ø Fol (mm)	7,7	9,5	12,4	
2º uso (%)	0 (0/4)	21,7 (5/23)	48,9 (23/47)	1: 0,4148 2: 0,01819 3: 0,0194
Média Ø Fol (mm)	7,6	9,5	12,7	
3º uso (%)	40,0 (2/5)	54,5 (12/22)	53,8 (28/52)	1: 0,5583 2: 0,5923 3: 0,8662
Média Ø Fol (mm)	7,7	9,7	12,7	

Classe do máximo diâmetro folicular = classe do maior diâmetro folicular no momento da IATF de acordo com o diâmetro.

Média Ø Fol = média do diâmetro folicular referente a cada classe folicular

Contraste 1: Classe 1 vs Classe 2; Contraste 2: Classe 1 vs Classe 3; Contraste 3: Classe 2 vs Classe 3.

Taxa de Prenhez

A taxa de prenhez foi influenciada pelo número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄ ($P < 0,05$) e pela concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação de forma linear positiva (Figura 5, $P < 0,05$). O efeito detectado do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P₄ sobre a taxa de prenhez revelou que as novilhas tratadas com dispositivos de 1º uso (20,5%, 30/146) e de 2º uso (22,7%, 29/128) apresentaram taxas de prenhez menores quando comparados aos animais tratados com dispositivos de 3º uso (35,5%, 44/124).

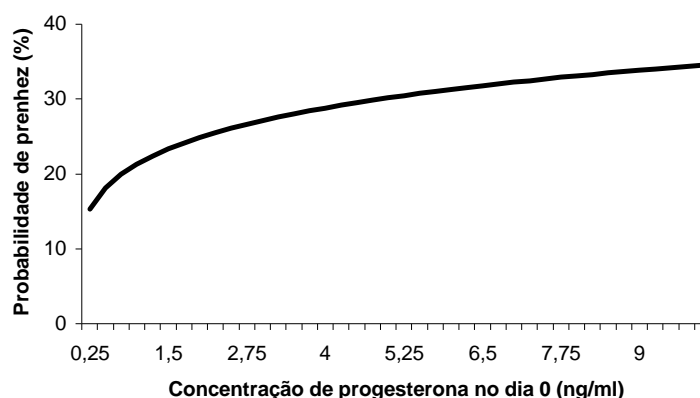


FIGURA 5: Probabilidade de prenhez das novilhas sincronizadas ao protocolo de acordo com o a concentração sérica de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação. ($P < 0,05$). Botucatu - SP, 2007.

5. DISCUSSÃO

O máximo diâmetro folicular a IATF não pôde ser avaliado nas novilhas que anteciparam a ovulação (62 novilhas, 1º uso CIDR: 25 novilhas, 2º uso CIDR: 19 novilhas, 1º uso CIDR: 18 novilhas), por este motivo, a discussão dos parâmetros diâmetro folicular, taxa de sincronização e taxa de concepção das novilhas

efetivamente sincronizadas, excluiu estas novilhas, no entanto, elas foram incluídas na taxa de prenhez.

Novilhas com maior concentração sérica de progesterona no dia 0 (início do protocolo) e novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P₄ de 3º uso (menor progesterona) apresentaram maior diâmetro folicular a IATF. Apesar destas influências serem aparentemente contraditórias, sugere-se que o maior diâmetro folicular, nestes dois casos, possa ser atribuído a menor concentração de P₄ circulante, considerando-se a concentração de P₄ no final do tratamento.

No caso da concentração de P₄ no dia 0, quando a concentração de P₄ endógena é maior no início do protocolo de sincronização da ovulação (dias 6 a 15 do ciclo estral) ela é na maioria dos casos menor no final do mesmo (dia 14 em diante do ciclo estral). Desta maneira, a menor concentração de P₄, possivelmente aumentou da frequência dos pulsos de LH, sendo este o fator responsável pelo aumento no diâmetro folicular, atuando desde o momento da luteólise espontânea no grupo de novilhas que regrediu o CL durante o protocolo.

Não foi detectado efeito das concentrações séricas de progesterona no dia 7 do protocolo de sincronização da ovulação no máximo diâmetro folicular a IATF, porém, foi detectado efeito do número de utilizações do dispositivo de P₄, logo, após a luteólise induzida no dia 7, as concentrações de progesterona restantes provenientes apenas do dispositivo intravaginal de P₄, possivelmente foram capazes de influenciar a pulsatilidade de LH.

Nas novilhas tratadas com dispositivos de P₄ de 3º uso, de acordo com SANTOS et. al. (2004), no vigésimo quinto dia de utilização do CIDR, a concentração sérica de P₄ possivelmente atingiu nível inferior a 1 ng/ml. Assim, os dispositivos de 3º uso, a partir do dia 7 do protocolo possivelmente geraram concentrações séricas de P₄ menores que 1 ng/ml, estimulando o aumento da pulsatilidade do LH, e conseqüentemente do aumentando o diâmetro folicular neste grupo em relação as novilhas tratadas com dispositivos de P₄ de 1º uso.

De acordo com dados da literatura existe uma relação inversa entre a concentração de P₄ e a pulsatilidade do LH. Rahe et al. (1980) relaram que, durante a fase lútea, quando a concentração de P₄ esteve entre 5 e 8 ng/mL, a

freqüência de pulsos de LH foi baixa, com um pulso a cada quatro horas e quando a concentração de P_4 foi mantida entre 1 e 2 ng/mL, a freqüência de pulsos de LH aumentou, com um ou mais pulsos a cada 2 horas. Posteriormente, Bergefeld et al. (1996) também observaram que, em vacas tratadas com baixas concentrações de P_4 , a freqüência na liberação pulsátil de LH e a secreção de E_2 foram maiores. Ginther et al. (1996), relataram uma relação positiva entre concentração de LH e o tamanho do folículo dominante, com a diminuição na freqüência dos pulsos de LH, diminuiu também a concentração média de LH e o diâmetro do folículo dominante.

Embora a pulsatilidade e a concentração sérica de LH não tenham sido avaliadas, de acordo com os resultados do presente estudo sugere-se que, o maior diâmetro folicular das novilhas que apresentaram alta concentração de progesterona no dia 0 do protocolo de sincronização da ovulação (Figura 2) e nas novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P_4 de 3º uso, podem ser explicados pelo efeito da menor concentração de P_4 no aumento da pulsatilidade e concentração sérica de LH, que atua no crescimento folicular.

Os resultados deste estudo são similares ao de diversos autores. Cup et al., em 1993, observaram que, em baixas concentrações de P_4 (1 a 2 ng/ml), o diâmetro folicular (17,3 mm vs 12,6 mm) e a taxa de crescimento de (1 mm por dia) foram maiores quando comparadas as de folículos que se desenvolveram em concentrações de P_4 mais altas (5 a 6 ng/ml). Posteriormente, Adams et al. (2002) observaram que, existe uma relação inversa entre, a concentração de P_4 e o diâmetro folicular em vacas de corte. Estes autores relataram que o diâmetro folicular foi maior no grupo de menor dosagem quando comparado a dosagem fisiológica ou dosagens maiores de P_4 ($1,9 \pm 0,2$ ng/ml: $15,8 \pm 0,4$ mm; $5,4 \pm 0,3$ ng/ml: $11,0 \pm 0,3$ mm e $9,4 \pm 0,4$ ng/ml: $10,3 \pm 0,0$ mm, respectivamente). Em 2004, Carvalho, encontrou maior diâmetro folicular nos dias 8 (retirada do dispositivo intravaginal de P_4) e 9 (momento da aplicação de BE), em novilhas que receberam $PGF2\alpha$ no início do protocolo de sincronização, bem como aumento nas taxas de crescimento folicular e na ovulação. Este autor sugeriu que, o aumento nas taxas de crescimento folicular nestes animais tenha sido mediado

pelos efeitos reduzidos dos níveis de P_4 circulante no aumento da frequência dos pulsos de LH, embora esta não tenha sido mensurada.

Por sua vez, o máximo diâmetro folicular a IATF influenciou positivamente a taxa de sincronização independente do número de utilizações do dispositivo intravaginal de P_4 . A diferença numérica de 10 pontos percentuais entre a taxa de sincronização das novilhas tratadas com dispositivos intravaginais de P_4 de 1º uso e de 3º uso, pode ser atribuída ao maior diâmetro folicular no momento da IATF nos animais tratados com 3º uso do CIDR.

O efeito do máximo diâmetro folicular a IATF na taxa de sincronização foi descrito anteriormente por Sá Filho (2007), em vacas Nelore pós-parto. Embora o diâmetro folicular descrito na literatura para novilhas Nelore no momento do desvio tenha sido de 5,7 mm (Sartoreli et al., 2005) e 6,2 mm (Gimenes et al., 2007), a variação da capacidade ovulatória de acordo com o diâmetro folicular em novilhas Nelore foi relatada por Gimenes et al. (2007) com resultados similares ao deste estudo, que utilizou a mesma divisão de classes de diâmetro folicular. Estes autores encontraram 33% (3/9) de ovulação em folículos de 7,0 a 8,4mm (média de 7,6 mm), 80% (8/10) em folículos de 8,5 a 10,0 mm (média de 9,6 mm) e 90% (9/10) em folículos maiores que 10 mm (média de 10,9 mm) e concluíram que embora folículos menores sejam capazes de ovular, a probabilidade é menor, mas aumenta de acordo com o aumento do diâmetro. Em gado holandês a aquisição da capacidade ovulatória ocorre apenas com 10 mm de diâmetro, embora o desvio folicular ocorra a partir de 8,5 mm.

A aquisição da capacidade ovulatória ocorre logo após a divergência, no entanto, uma alta dose de LH é necessária para a ocorrência da ovulação (Sartori et al., 2001). Com o crescimento do folículo dominante, a síntese de receptores de LH pelas células da granulosa aumenta (Bao et al., 1997) juntamente com a atividade do AMPc em resposta ao LH (Jolly et al., 1994), resultando em maior capacidade ovulatória (Sartori et al., 2001). Estas observações em conjunto explicam o efeito detectado do diâmetro folicular sobre a taxa de sincronização.

O máximo diâmetro folicular a IATF também influenciou a taxa de concepção. A análise das classes foliculares nas diferentes utilizações do CIDR'

1º, 2º e 3º usos, revelou que, folículos menores do que 10 mm apresentaram menor concepção nas novilhas sincronizadas com dispositivos de P₄ de 1º e 2º usos, enquanto que no 3º uso a taxa de concepção foi similar nas diferentes variações de diâmetro folicular. Este resultado pode possivelmente ser explicado pela duração do proestro.

Da mesma maneira, nas novilhas que tinham alta concentração de P₄ no dia 0 e provavelmente regrediram o CL antes do momento da indução da luteólise no tratamento, a duração do proestro pode ter sido maior.

O proestro natural é o momento do ciclo estral em que a concentração de progesterona cai devido a luteólise e a produção de estradiol pelo folículo aumenta devido a maturação folicular. Nos tratamentos o momento em que a concentração de P₄ cai (pela luteólise induzida ou pela retirada da fonte exógena de progesterona) e a produção de estradiol pelo folículo aumenta mimetiza o proestro natural.

A relação positiva entre a duração do proestro mimetizado em protocolos hormonais e a concepção foi recentemente descrita por outros autores (Mussard et al., 2002, 2003 e Bridges et al., 2004, Day 2005 e Day e Bridges, 2006).

Quanto a caracterização hormonal dos tratamentos de proestro curto vs longo, Bridges et al. (2004) encontraram que, o pico de LH foi similar entre os tratamentos. A incidência de ciclos curtos tendeu a ser maior e as concentrações de progesterona no ciclo estral subsequente tenderam a ser menores no tratamento de proestro curto vs longo. O estradiol no período pré-ovulatório foi maior quando o proestro foi longo, durante as 32 horas que antecederam a administração de GnRH. Ao avaliarem a taxa de concepção de acordo com o estradiol pré-ovulatório independente de tratamento os autores encontraram concepção de 88,9% para animais com estradiol > 10 pg/ml e 14,3% para animais com estradiol < 10 pg/ml.

Ao analisar 4 experimentos conjuntamente, Day (2005) e Day e Bridges, 2006, observaram que, a duração do proestro foi o parâmetro avaliado que foi capaz de prever mais precisamente os resultados de concepção, quando comparado ao diâmetro do folículo dominante e a idade folicular (Tabela 2). Um

aspecto inovador na pesquisa destes autores foi a persistência de maiores resultados na concepção a IATF de novilhas submetidas ao tratamento de proestro de maior duração, mesmo quando o diâmetro do folículo ovulatório foi similar nos dois tratamentos (Exp 4, Tabela 2).

Outros estudos também observaram relação positiva entre o diâmetro folicular e a concepção. Assim, Perry et al. (2004), observaram efeito quadrático do diâmetro folicular na concepção em novilhas *Bos taurus* ao utilizar o protocolo Co-synch (GnRH - 7d - PGF - 2d - GnRH + IATF), e a variação do diâmetro considerada ótima foi entre 11,5 e 16 mm.

Mussard et al. (2002), observaram também em novilhas *Bos taurus*, maior taxa de concepção em folículos que ovularam espontaneamente (100%, 24/24) quando comparados a folículos induzidos a ovular com GnRH quando atingiram 10 mm (75,9%, 22/29).

Em um segundo experimento, os mesmos autores observaram maior taxa de concepção em FD induzidos a ovular (GnRH) com 13 mm, média $13,6 \pm 0,2$ mm (57,4%, 31/54) quando comparados a FD induzidos a ovular com 10 mm, média de $11,2 \pm 0,2$ mm [4,4%, 2/45, Mussard (2003)].

A maior taxa de concepção observada em novilhas sincronizadas com o 3º uso do dispositivo intravaginal de progesterona parece estar relacionada principalmente a concepção mais alta dos folículos menores do que 10 mm neste grupo de novilhas em relação as novilhas sincronizadas com dispositivo intravaginal de P₄ de 1º e 2º usos.

De acordo com Santos et al. (2004), o dispositivo intravaginal de P₄, CIDR[®], apresentou concentrações séricas de progesterona menores do que 1 ng/ml a partir do vigésimo quinto dia de utilização contínua. Após a indução da luteólise com PGF2 α no dia 7 do protocolo utilizado no presente estudo, os níveis de P₄ estariam portanto possivelmente menores que 1 ng/ml nas novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P₄ de 3º uso. De acordo com a fisiologia natural do ciclo estral, a maturação do folículo durante o proestro ocorre quando as concentrações plasmáticas de P₄ são inferiores a 1 ng/ml (Stok e Fortune, 1993). Assim, sugere-se que as novilhas tratadas com dispositivos intravaginais de P₄ de 3º uso, teriam

iniciado o proestro antes em relação as novilhas tratadas com dispositivos de 1° e 2° uso, a partir da luteólise induzida no dia 7 e que a maior duração do proestro nestas novilhas seja outro fator que possivelmente influenciou positivamente a concepção.

O modo como a maior duração do proestro atua melhorando a fertilidade não está claro, no entanto, os melhores resultados em novilhas que foram submetidas a tratamento de proestro longo com transferência de embrião, permitiram aos autores sugerir que a incompetência do oócito, a fertilização comprometida e a mortalidade embrionária precoce podem não ser o mecanismo principal responsável pela redução na fertilidade associada a ovulação de folículos ovarianos pequenos e que foram coincidentemente submetidos a menor período de proestro. A concentração de P₄ no ciclo estral subsequente aos tratamentos realizados nos experimentos descritos por Day (2005) e Day e Bridges (2006) foi consistentemente maior quanto maior foi a duração do proestro (Tabela 2), sendo este um dos benefícios promovidos e possivelmente responsável pelos melhores resultados nos tratamentos de proestro longo.

Embora a dimensão do CL e a concentração de P₄ no ciclo subsequente não tenham sido avaliadas no presente estudo, sugere-se que a maior taxa de concepção nas novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P₄ de 1° e 2° usos, que ovularam folículos de maior diâmetro possa estar relacionada ao possível maior diâmetro do CL e conseqüentemente da maior concentração de progesterona no ciclo subsequente.

De acordo com a literatura, o diâmetro do folículo dominante está diretamente relacionado ao diâmetro do CL subsequente (Vasconcelos et al, 2001, Sá Filho et al, 2004) e o volume do CL por sua vez está relacionado positivamente a secreção de progesterona (Vasconcelos et al, 1999) e esta com a fertilidade (Vasconcelos et al, 2001, Sá Filho et al, 2004).

Assim sendo, após a realização de diversos experimentos Day (2005) e Day e Bridges (2006) concluíram que a concepção parece estar mais precisamente relacionada a capacidade esteroidogênica do folículo dominante durante o proestro e ao CL resultante, do que ao diâmetro ou idade do folículo no

momento do pico de LH. Além disso, tendo em vista os resultados dos experimentos que utilizaram TE (Sá Filho et al, 2004 apud Day, 2005, Mussard et al., 2003), foi sugerido que as alterações produzidas pela ovulação de folículos imaturos (diminuição do estradiol pré-ovulatório e da progesterona na fase lútea média), interferem na habilidade do útero em sustentar o embrião (alterando o ambiente uterino), mais do que na incompetência do oócito ou mesmo falha de fertilização. O ambiente uterino alterado (menor E_2 a ovulação e menor concentração de P_4 no ciclo estral subsequente) poderia gerar falhas gestacionais diretamente por não proporcionar um ambiente adequado para o embrião, levando a sua morte, ou indiretamente, por não dar o suporte adequado ao crescimento embrionário, que poderia levar a uma diminuição do tamanho do conceito e consequente falha no processo de reconhecimento materno da gestação.

A maior taxa de prenhez em relação a maior concentração de P_4 no dia 0 (FIGURA 5) e nas novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de P_4 de 3º uso em relação as novilhas tratadas com dispositivos de 1º e 2º uso, pode ser atribuída aos efeitos destes na taxa de sincronização e concepção, pois a taxa de prenhez é o resultado da taxa de sincronização e da taxa de concepção no total dos animais tratados.

RESUMO

- 1) A hipótese de que concentração sérica de progesterona no início do protocolo não interfere nos resultados foi rejeitada. A progesterona no dia 0 do tratamento influenciou o diâmetro do maior folículo no momento da IATF, tendeu a influenciar a taxas de concepção e influenciou a taxa de prenhez. No caso do diâmetro do maior folículo no momento da IATF sugeriu-se que concentração sérica mais baixa de progesterona ao final do protocolo, aumentou o diâmetro folicular através do aumento na pulsatilidade de LH e que nestes animais o proestro parece ter sido mais longo influenciando positivamente também a concepção.
- 2) A hipótese de que a concentração sérica de progesterona no dia 7 do protocolo não interfere nos resultados a IATF devido a indução de luteólise no dia 7 foi confirmada.
- 3) A hipótese de que a concentração residual de progesterona após o dia 7, momento em que é induzida a luteólise, proveniente apenas dos dispositivos de progesterona não é suficiente para bloquear a liberação do LH e não influencia portanto os resultados ao protocolo proposto foi rejeitada. A terceira utilização do dispositivo de progesterona provavelmente gerou concentrações séricas de P_4 inferiores a 1 ng/ml a partir do dia 7 do protocolo proposto, o que levou primeiramente ao aumento do diâmetro folicular neste grupo, provavelmente pelo efeito da menor concentração de progesterona na pulsatilidade de LH e conseqüentemente no diâmetro folicular. Foi observada também melhor taxa de concepção e conseqüentemente de prenhez no grupo tratado com o terceiro uso do dispositivo de progesterona em relação aos demais grupos. Sugeriu-se neste caso que somou-se ao efeito da progesterona no diâmetro do maior folículo no momento da IATF o efeito da maior duração do proestro neste grupo.

6. CONCLUSÕES

A maior concentração de P₄ no início dos protocolos, melhorou a fertilidade de novilhas zebuínas na IATF.

O dispositivo intravaginal de P₄ (CIDR), utilizado previamente por 18 dias, quando comparado ao dispositivo sem uso prévio e usado previamente por 9 dias, melhorou a fertilidade de novilhas zebuínas a IATF.

IMPLICAÇÕES

A duração do proestro parece ser um importante parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de protocolos de sincronização da ovulação em novilhas Nelore ciclando.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS GP, KOT K, SMITH CA, GINTHER OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Can J Anim Sci**; v.73, p.267-275, 1993.

ADAMS GP, MATTERI RL, KASTELIC JP, KO JCH, GINTHER OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil.**, v. 94, p. 177-188, 1992.

AHMAD, N., F. N. SCHRICK, R. L. BUTCHER, AND E. K. Inskeep. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biol. Reprod.** v.52, p.1129-1135, 1995.

ALLANHELD, OSMUN & CO., MONTCLAIR, NJ. KASTELIC, J. P. AND O. J. GINTHER. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. **Anim. Reprod. Sci.**, v.26, p.1-24, 1991.

ANUALPEC, 2006.

BAO, B., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1158-1168, 1997.

BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of the oestrous cycle to improve artificial insemination or embryo transfer programs, Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, Brazil, v. 26 (Suppl.), p. 179–198 , 1998.

BARUSELLI, PS, REIS, EL, MARQUES, MO, NASSER, LF, BÓ, GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BERGFELD, E.G.M., KOJIMA, F.N., CUPP, A.S., WEHRMAN, M.E., PETERS, K.E., MARISCAL, V., SANCHEZ, M., KINDER. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β estradiol in fêmeas bovinas. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 546-553, 1996.

BINELLI, M., HAMPTON, J., WILLIAM, C. B. AND THATCHER, W. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrous. **Biol. Reprod**, v.61, p.127-134, 1999.

BÓ G.A., BARUSSELI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle, **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.307-326, 2003.

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

BO, G.A., ADAMS, G.P., NASSER, L.F., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J., 1993a. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.225–239, 1993.

BO, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRÍBULO, R., TRÍBULO, H., MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave

development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53–72, 2002a.

BO, G.A., MARTINEZ, M., NASSER, L.F., CACCIA, M., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J. Follicular dynamics in *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: Proceedings of the 10th **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, vol. 2. Campo Grande, p. 221 (abstract), 1993.

BRIDGES, A, MUSSARD, ML, GASSER, CL, GRUM, DE, AND DAY, ML. Influence of duration of proestrous on circulating estradiol, the LH surge and luteal function in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.82, (Supl. 1), p.102. Abstr. 102, 2004.

BURATINI JR., J., PRICE, C.A., VISINTIN, J.A., BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p.421–431, 2000.

BURKE CR, MUSSARD ML, GRUM DE, DAY ML. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Anim. Reprod. Sci.**, v.66: p.161–74, 2001.

BURKE, C.R., MACMILLAN, K.L., BOLAND, M.P. 1996. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced Suppression of lh release in ovariectomised cows. **Anim Reprod Sci.**, v.45, p.13–28, 1996.

BURKE, C.R., MUSSARD, M.L., GASSER, C.L., GRUM, D.E., DAY, M.L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. 2003. **Theriogenology**, v.60, p.647–658, 2002.

CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* X *Bos taurus* e *Bos taurus*. Tese de doutorado apresentada a FMVZ-USP, 2004.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G.P., BRITO L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers, **Anim. Reprod. Sci.**, v. 98, p.189–196, 2007.

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

CEPEA, ESALQ USP. www.cepea.org.br.

COLAZO, M.G., KASTELIC, J.P., WHITTAKER, P.R., GAVAGA, Q.A., WILDE, R., MAPLETOFT R.J. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Anim. Reprod. Sci.**, v.81. p.25–34, 2004.

CUPP, A., GARCIA-WINDER, M., ZAMUDIO, A., MARISCAL, V., WEHRMAN, M., KOJIMA, N., PETERS, K., BERGEFELD, E., HERNANDEZ, P., SANCHEZ, T. KITOK, R., KINDER, J. Concentration of progesterone (P₄) in circulation has differentialeffect on biochemical characteristics of dominant follicles in cows. **J. Anim. Sci.**, v.71 (Supl. 1), p.211, 1993.

DAY, M.L. E BRIDGES, G.A. Impacto das concentrações de hormônios esteróides sobre a fertilidade de bovinos. In **X Curso Novos Enfoques da Produção e Reprodução de Bovinos**, CD-ROOM, 2006a.

DAY, M.L. Efeito de estratégias de sincronização da ovulação no desenvolvimento folicular e na concepção. In **IX Curso Novos Enfoques da Produção e Reprodução de Bovinos**, CD-ROOM, 2005b.

DAY, M.L. Protocolos de sincronização comumente utilizados em novilhas nos EUA. In **IX Curso Novos Enfoques da Produção e Reprodução de Bovinos**, CD-ROOM, 2005a

FARIN, C. E., K. IMAKAWA, T. R. HANSEN, J. J. MCDONNELL, C. N. MURPHY, P. W. FARIN, AND R. M. ROBERTS. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biol. Reprod.**, v. 43, p. 210-218, 1990.

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

GARRETT, J. E., R. D. GEISERT, M. T. ZAVY, AND G. L. MORGAN. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **J. Reprod. Fert.** v. 84, p. 437-446, 1988.

GEARY T. W., J. C. WHITTIER, D. M. HALLFORD, AND M. D. MACNEIL. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or Co-Synch protocol. **J. Anim. Sci.** v.79, p.1-4, 2001.

GEARY, T.W., DOWNING, E.R., BRUEMMER, J.E. AND WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to select synch estrous synchronization protocol. **J. Anim. Sci.**, v.16, p.1, 2000.

GEISERT, R. D., M. T. ZAVY, B. G. BIGGERS, J. E. GARRETT, AND R. P. WETTEMANN. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 16, p. 11-25, 1988.

Genoma funcional do boi. Revista DBO, v.22, n.271, p.116-124, 2003.

GIMENES, L.U., CARVALHO, N.A.T., SÁ FILHO, M.F., AYRES, H., TORRES-JÚNIOR, J.R.S., SOUZA, A. H., BÓ, G.A., BARROS, C.M., SARTORELLI, E.S., BARUSELLI, P.S. E MAPLETOF, R.J. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **J. Reprod. Fertil.** (suppl 1), p. 242, abstract 251, 2007.

GINTHER O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J,R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.

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

GODKIN, J. D., F. W. BAZER, J. MOFFATT, F. SESSIONS, AND R. M. ROBERTS. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. **J. Reprod. Fertil.** 65:141-150, 1982.

HAFEZ ESE. Anatomy of female reproduction. In: Reproduction in Farm Animal. Philadelphia: Lea & Febiger;23, 1993.

ING, N. AND Y. ZHANG. Cell-specific expression of estrogen-responsive genes in the uteri of cyclic, early pregnant and ovariectomized ewes. **Theriogenology** v. 62, p. 403-414, 2004.

JOHNSON, M. L., D. A. REDMER, AND L. P. REYNOLDS. Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 588-596, 1997.

JOLLY, P.D., TISDAL, D.J., HEATH, D.A., LUN, S., MCNATTY, K.P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cycling adenosine 3', 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. **Biol. Reprod.**, v.51, p.934-944, 1994.

KASTELIC, J. P., L. KNOPF, AND O. J. GINTHER. Effect of day of prostaglandin F₂ α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Anim. Reprod. Sci.** v.23, p.169-180, 1990.

KIMMINS, S., H. C. LIM, AND L. A. MACLAREN. Immunohistochemical localization of integrin alpha V and beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. **Reprod. Biol. Endocrin.** v. 2, p. 19-32, 2004.

KING, G. J., B. A. ATKINSON, AND H. A. ROBERTSON. Development of the bovine placentalome from days 20 to 29 of gestation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 59, p. 95-100, 1980.

LAMB, G.C., LARSON, J.E., GEARY, T.W., STEVENSON, J.S., JOHNSON, S.K., DAY, M.L., ANSOTEGUI, R.P., KESLER, D.J., DEJARNETTE, J.N., LANDBLOM, D. Synchronization of estrous and artificial insemination in replacement beef heifers using GnRH, PGF₂ α and progesterone. **J. Anim. Sci.**, v.84, p.3000-3009, 2006.

LAMB, G.C.; NIX, D.W.; STEVENSON, J.S.; CORAH, L.R. Prolonging MGA-prostaglandin F₂ interval from 17 to 19 days in estrus synchronization system for heifers. **Theriogenology**, v.53, p.691-698, 2000.

LAMMING, G. E., AND G. E MANN. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F₂ α production in cows by progesterone and oestradiol. **J. Reprod. Fertil.**, v. 103, p. 69-73, 1995

LARSON, JE, LAMB, CG, GEARY, TW, STEVENSON, JS, JOHNSON, SK, DAY, ML, KESLER, DJ, DEJARNETTE, JM. Synchronization os estrous in replacement heifers using GnRH, PGF2 α e progesterone (CIDR): a multilocation study. **J. Anim. Sci.**, v.82 (Suppl 1), p.369, Abstr. 223, 2004.

LOWMAN, B.G., SCOTT, N., SOMERVILLE, S. Condition scoring of cattle. Bulletin East Scotland College Agriculture, n $^{\circ}$ 6, 1976

MACMILLAN, K. L., AND A. J. PETERSON.. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronization, increasing pregnancy rates, and the treatment of postpartum anestrus. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.1–25, 1993.

MANN, G. E. AND G. E. LAMMING. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reprod. Dom. Anim.** v. 34, p. 269-274, 1999.

MANTOVANI, A.P., REIS, E.L., GACEK, F., BÓ, G.A., BINELLI, M., AND BARUSELLI, P.S. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR $^{\circledR}$) for induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. **Anim. Reprod. Sci.**, v.2, n4, p.272-277, 2005.

MANTOVANI, AP, SÁ FILHO, MF, REIS, EL, NICHI, M, BÓ, GA, BARUSELLI, PS. Efeito da concentração sérica de progesterona na dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* X *Bos taurus*. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, (Supl. 1), 2005.

MARQUES, MO, SÁ FILHO, MF, GIMENIS, LU, FIGUEIREDO, TB, SÓRIA, GF, BARUSELLI, PS. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo de progesterona na taxa de

concepção a inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Scientiae Veterinarie** v.33, p.287, (Supl.1), 2005.

MARTINEZ, M.F, KASTELICB, J.P., MAPLETOFT, R.J. 2004. The use of estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. **Theriogenology**, v.62, p.363–372, 2004.

MARTINEZ, M.F. JOHN P. KASTELIC, GREGG P. ADAMS, EUGENE JANZEN, DUANE H. MCCARTNEY, REUBEN J. MAPLETOFT. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH, *Can Vet J*; v. 41, p. 786-790, 2000.

MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., ADAMS, G.P., COOK, R.B., OLSON, W.O., MAPLETOFT, R.J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v.57, p.1049-1059, 2002a.

MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J. The use of a progesterone releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed time AI in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.1746-1751, 2002b.

MCGOWAN, M.R., CARROLL, C.L., DAVIES, F.J. Fixed-time insemination of *Bos indicus* heifers following the use of Syncro-Mate-B (SMB) to synchronize estrus. **Theriogenology**, v.37, p.1293–1300, 1992.

MIHM, M., N. CURRAN, P. HYTTEL, M. P. BOLAND, AND J. F. ROCHE. Resumption of meiosis in cattle oocytes from preovulatory follicles with a short and a long duration of dominance. **J. Reprod. Fertil.** v.13, p.14 (Abstr.), 1994.

MIKESKA, J.C., WILLIAMS, G.L. Timing of preovulatory endocrine events, estrus and ovulation in Brahman x Hereford females synchronized with norgestomet and estradiol valerate. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.939–946, 1988.

MILLER, B. G. AND N. W. MOORE. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. **J. Reprod. Fertil.**, v. 46, p. 535-536, 1976a.

MILLER, B. G. AND N. W. MOORE. Progesterone and oestrogen requirements for the survival of embryos in the ovariectomized ewe. **J. Reprod. Fertil.** v. 46, p. 536-537, 1976b.

MOREIRA, F. C. ORLANDI, C. RISCO, F. LOPES, R. MATTOS, AND W. W. THATCHER. Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: cyclic versus anestrus cows. **J. Dairy Sci.** v.83(Suppl 1), p.134 (Abstr.), 2000.

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

MURPHY MG, BOLAND MP, ROCHE JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. **J Reprod Fertil**; v.90, p.523-533, 1990.

MURRAY, M. K. The effect of estrogen and progesterone on structural changes in the uterine glandular epithelium of the ovariectomized sheep. **Biol. Reprod.** V. 47, p. 408-417, 1992.

MUSSARD, M. L., C. R. BURKE, AND M. L. DAY. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: Proceedings of the **Annual**

Conference of the Society for Theriogenology, Columbus, OH, p. 179-185, 2003.

MUSSARD, ML, BURKE, CR, BEHLKE, EJ, GASSER, CL, ROBINSON, AR, KINDER, JE E DAY, ML. Influence of premature induction of LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. **Biol Reprod.**, v.66: (Suppl. 1), p.266, (abstract.415). 2002.

MUSSARD, ML, BURKE, CR, GASSER, CL BEHLKE, EJ, COLLIFLOWER, KA, GRUM, DE E DAY, ML. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominant follicles of early or late maturity. **Biol Reprod.**, v.68: (Suppl. 1), p.332 (Abstr. 535) 2003.

PATERSON, D.J., KOJIMA, F.N., SMITH, M.F. A review of methods to synchronize estrous in replacement beef heifers and post-partum cows. **J. Anim. Sci.**, v.81, (Suppl.2), E166-177. Online available: www.asas.org/symphosia/03esupp2/jass2402.pdf, 2003.

PERRY, GA, SMITH, MF, ROBERTS, AJ, MACNEIL, MD, GEARY, TW. Effect of ovulatory follicle size on pregnancy rates and fetal mortality in beef heifer. **J. Anim. Sci.**, v.82, (Suppl. 1), p.101, (abstract 99), 2004.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O. PADOVANI, C.R. Estrous behavior and estrous to ovulation interval in Nelore cattle *Bos indicus* with natural estrous or estrous induced with prostaglandin or norgestomet and estradiol valerate, **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

PURSLEY, J. R., R. W. SILCOX, AND M. C. WILTBANK. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and

gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.81, p.2139-2144, 1998.

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

PUSHPAKUMARA, P.G., R. S. ROBINSON, K. J. DEMMERS, G. E. MANN, K. D. SINCLAIR, R. WEBB, AND D. C. WATHES. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. **Reprod.** v. 123, p. 859-868, 2002.

RAHE, C.H., OWENS, R.E., FLEEGER, J.L., NEWTON, H.J., HARMS, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v.107, p.498-503, 1980.

REVAH, I., AND W. R. BUTLER. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.39-47, 1996.

ROBINSON, R. S., G. E. MANN, G. E. LAMMING, AND D. C. WATHES. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reprod.** v. 122, p. 965-979, 2001.

ROCHE, J. F., E. J. AUSTIN, M. RYAN, M. O'ROURKE, M. MIHM, AND M. G. DISKIN. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.** (suppl), v.54, p.61–71, 1999.

ROY, G.L., TWAGIRAMUNGER, H. Time interval between GnRH e PGF injections influences the precision of estrous synchronized cattle. **Theriogenology**, v.51, p.413 (Abstr), 1999.

SÁ FILHO, M.F., PENTEADO, L., REIS, E.L., GIMENIS, L.U., BARUSELLI, P.S. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinarie** v.33 (supl.1), p.265, 2005.

SÁ FILHO, O.G. Efeito de tratamentos com progesterone e/ou estradiol na incidência de regressão prematura de corpo lúteo após a primeira ovulação em vacas Nelore pós-parto. Tese de mestrado apresentada a FMVZ-Unesp, Campus de Botucatu, 2007.

SÁ FILHO, O.G., VASCONCELOS, J.L.M., SANTOS, R.M, OBA, E., PEREZ, GC, ARAÚJO, DB. Efeito da aplicação de PGF 2α no protocolo de transferência de embriões em tempo fixo nas taxas de sincronização e concepção em receptoras de embriões FIV. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33 (supl.1), p.117, 2005.

SÁ FILHO, OG, VASCONCELOS, JLM, SANTOS, RM, OBA, E, PEREZ, GC. Effects of PGF 2 alfa in fixed time embryo transfer protocol on synchronization and conception rates in IVF fresh embryo recipients. **Journal of Animal Science** (Suppl 1), 2005, 83, 168 (Abstract)

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREZ, G. C.; MACIEL, A. B. B.; SÁ FILHO, O. G. Serum progesterone concentrations in Nelore x Angus heifers treated with 1.38-g or 1.9-g CIDR devices. **Journal of Animal Science** (Suppl. 1), 82, 370, 2004 (Abstract).

SANTOS, RM, VASCONCELOS JLM, MENEGUETTI M. et al. Efeito da ovulação à primeira aplicação de GnRH em protocolos de inseminação artificial

em tempo fixo nas taxas de sincronização e prenhez em vacas de leite em lactação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p.437-438, Jul./Set, 2003

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

SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C.P., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity an bovine follicles. **Biol Reprod.**, v.65, p.1203-1409, 2001.

SARTORI, R., HAUGHIAN J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G.J.M., E WILTBANK, M.C. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. **J. Dairy Sci.** v.87, p.905–920, 2004.

SIROIS. J., AND J. E. FORTUNE. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low concentrations of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, v.127, p.916-925, 1990.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v.132, p.1108-14, 1993.

STUTTS, K.J., FORREST, D.W., LOONEY, C.R. Fixed-time insemination utilizing an Eazi Breed CIDR in combination with gonadotropin-releasing hormone or estradiol cypionate. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.371, (Abstr. 233), 2004.

THATCHER W, DROST M, SAVIO JD, MACMILLAN KL, ENTWISTLE KW, SCHMITT EJ, DE LA SOTA RL, MORRIS GR. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 33, p. 27-49, 1993.

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

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

WEHRMAN, M.E., FIKE, K.E., MELVIN, E.J., KOJIMA, F.N AND KINDER, J.E. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17β estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1413-1421, 1997.

WILLIAMS, S.W., STANKO, R.L., AMSTALDEN, M., WILLIAMS, G.L. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. **J. Anim. Sci.** v.80, p.1173–1178, 2002.

Progesterone concentration during a protocol, moment of prostaglandin F_{2α} administration and eCG affect fertility to timed artificial insemination in Nelore cycling heifers

Carolina C. Dias^a, José L. M. Vasconcelos^a

^a *Departamento de Produção e Exploração Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, SP, Brazil”*

ABSTRACT

We tested the hypotheses that progesterone concentrations during TAI treatment would not affect fertility (*Experiment-1*) and PGF_{2α} anticipation plus an 18d previously used CIDR and/or eCG would improve fertility to TAI, but not to AI after estrous detection (*Experiment-2*). Heifers with CL (*EXP1*, $n=398$) were treated with EB and a CIDR device (D0), PGF_{2α} (D7), CIDR withdraw and ECP (D9) and TAI (D11). Blood samples were collected (D0, D7). Maximum follicular diameter (MFD) was recorded (D9). Ovulation (D13) and pregnancy diagnoses (D41) were evaluated. Heifers detected in heat within 21d (*EXP2*, $n=406$) were treated similarly to *EXP1*. Treatments were PGF_{2α} (D7 or D9) and eCG addition or not (D9). Heifers were either TAI ($n=199$) or AI after estrous detection ($n=132/207$?? 125/202??). Pregnancy rate was evaluated (D41). In both experiments, heifers were randomly assigned to receive CIDR with no previous use (1stuse), previously used by 9D (2nduse) or 18D (3rduse). Continuous variables were analyzed by PROC-GLM and binomial variables by PROC-LOGISTIC (significance= $P < 0.05$, tendency= $P < 0.1$). On *EXP1*, 3rduse CIDR had less D7 progesterone concentration, larger MFD, greater CR (synchronized heifers) and PR than 1st and 2nduse CIDR treatments. Progesterone on d0 positively affected MFD, CR and PR at TAI. The MFD positively affected overall SR, but CR only for 1st and 2nduse CIDR treatments. On *EXP2*, interactions between PGF_{2α}/eCG and CIDR/eCG treatments were detected. The eCG increased 1st use CIDR PR, tended to increase 2nd use CIDR PR, but not 3rduse CIDR PR and increased d9PGF_{2α} PR, but not d7PGF_{2α}. Greater progesterone before TAI decreases conception probably because of

shorter proestrus length and AI conception after estrus detection is greater because of adequate proestrus length.

Key words: heifers pregnancy proestrus

1. Introduction

Artificial insemination is the main technique available to introduce genetics on a herd, and fixed timed artificial insemination protocols have been developed to bypass the challenges associated with estrous detection. The need of TAI protocols for *Bos indicus* breeds is higher, because of shorter duration of estrous behavior compared with *Bos taurus* breeds (Pinheiro et al. 1998).

Conception rate to TAI treatments is similar to that observed at AI after estrus detection in cows (Pursley, 1998, Geary, 1998), however, for heifers fertility of current available TAI treatments is lower. (Lamb et al, 2000, 2006 Paterson et al, 2003).

Reasons for lower fertility to TAI programs on heifers are related to lower synchronization rates (Pursley et al, 1995) and/or lower conception rates (Peters e Pursley, 2003, Mussard et al, 2007). One of the factors affecting fertility to TAI in females is maturity of dominant follicles induced to ovulate (Peters & Pursley, 2003, Mussard et al., 2007).

Progesterone concentration during follicular development seems to interfere on dominant follicle maturity (Ginther et al., 1996), through its effect on LH (Rahe et al., 1980). Premature induction of ovulation compromises subsequent luteal function and decreases gestational conception, however, an increase in the time between progesterone declines until the LH surge increases subsequent luteal function and pregnancy rates (Peters & Pursley, 2003, Mussard, 2007).

Equine chorionic gonadotrophin (eCG) performs FSH and LH function (Murphy & Martinuk, 1991). There are some evidences that it can promote an increase on subsequent luteal function (Marques et al., 2003).

A first experiment was designed to evaluate if serum progesterone concentrations at initiation of protocol (day 0) or at the expected time of follicular deviation (day 7) would affect results to TAI. Our working hypotheses were: 1): serum progesterone concentrations at the beginning of the protocol will not

affect the results because did not affect the ability of estradiol to inhibit FSH and consequently did not affect the new follicular wave emergency; 2) Serum progesterone concentrations at day 7 will not affect the results because of PGF_{2α} administration on day 7, would induce regression of corpus luteum (luteolysis) and consequently progesterone concentration decrease, increasing LH pulsatility at follicular deviation, and; 3) exogenous progesterone of CIDR devices of different previous length of use is not enough to affect results. Experiment 2 was designed to evaluate if PGF_{2α} injection at day 7 or 9 on the protocol with or without an eCG injection at day 9 would affect pregnancy rate after TAI or conception rate after estrus detection. For this experiment, our working hypothesis were that low conception in Nelore heifers to TAI protocol occurs because of lower LH preceding AI and that PGF_{2α} on day 7 of the protocol with 3rd use CIDR devices will decrease progesterone concentrations increasing LH and/or that eCG treatment could restore fertility to TAI, by increasing LH. In heifers bred after estrus detection, conception will not be affected.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design, Location and Heifers

Experiment 1

To evaluate the effects of progesterone concentrations at the beginning of the protocol (day 0) and at expected time of follicular deviation (day 7) on pregnancy rates after TAI, Nelore heifers (525) aging between 24 to 26 months and with body condition score (BCS) between 2.75 and 3.25 (1 to 5 scale, Lowman et al., 1976) were evaluated by ultrasound (Aloka SSD 500V; with a 7.5 MHz linear-array intrarectal transducer) seven days before the initiation of the protocol. This trial was conducted at Novo Horizonte farm (Coxim, MS, Brazil) between November and December 2005. Heifers (n=398) with presence of luteal tissue were randomly assigned to receive a progesterone releasing intravaginal device (CIDR®, Pfizer Animal Health, Guarulhos, Brazil) with no previous utilization (1st use), with 9 days of previous use (2nd use) or with 18 days of previous use (3rd use) and all heifers were injected with 2 mg of

EB (i.m., Estrogin® - Farmavet, Brazil) at the initiation of the protocol. Heifers were maintained on two pastures (*Brachiaria humidicola*) with mineral salt *ad libitum*. A blood sample for progesterone evaluation was collected before insertion of CIDR devices. Seven days later PGF_{2α} was administered (12.5 mg, i.m., Lutalyse®, Pfizer Animal Health, Guarulhos, Brazil) and another blood sample was collected. Two days later progesterone devices were removed and heifers received an estradiol cypionate injection (0.5 mg, i.m., ECP®, Pfizer Animal Health, Brazil). Heifers were FTAI, 48h after CIDR® withdraw, by two technicians, using the same frozen-thawed bull semen. Transrectal ultrasonography examinations were performed on day 11 to access diameter of largest follicle at FTAI (defined as the average between horizontal and vertical diameters); on day 13 to evaluate ovulation (defined as absence of largest follicle previously measured at TAI); and on day 41 to pregnancy diagnoses. Heifers with multiple small follicles (< 6 mm) at the time of TAI were considered to have anticipated ovulation and were included on analyses of ovulation and pregnancy rates, but not on synchronization and conception of effectively synchronized rates (Figure 1).

Experiment 2

This experiment was designed to evaluate if PGF_{2α} injection at day 7 or 9 on the protocol with or without an eCG (300 IU) injection at day 9 affect pregnancy rate after FTAI or conception rate after estrus detection in Nellore cycling heifers. This experiment was conducted at Novo Horizonte farm (Coxim, MS, Brazil) between November, 2006 and January 2007. Nellore heifers (n=650) were observed for estrus for 21 days before initiation of the protocol and were between 24 to 26 months and with body condition score (BCS) between 2.75 and 3.25 (1 to 5 scale, Lowman et al., 1976). Heifers detected in estrus were considered cycling heifers (n = 411) and were maintained on two pastures (*Brachiaria humidicola*) with mineral salt *ad libitum*. All heifers received on d0 an injection of 2 mg of EB (i.m., Estrogin® - Farmavet, Brazil) and were randomly assigned to receive the insertion of the progesterone releasing intravaginal device (CIDR®, Pfizer Animal Health, Guarulhos, Brazil) with no previous utilization, 1st use; with 9 days of previous use, 2nd use; or with 18 days of previous use, 3rd use. Heifers were randomly assigned into four treatment groups (Fig. 2), in a 2 x 2 factorial design (PGF_{2α} on d7 vs d9; 12.5 mg, i.m., Lutalyse®,

Pfizer Animal Health, Guarulhos, Brazil) and eCG (0 vs 300IU, i.m., Folligon®-Intervet). On d9 CIDR devices was removed.

Heifers were randomly assigned to receive TAI, 48h after CIDR withdraw, or AI after estrus detection. Heifers from group TAI received an estradiol cypionate injection (0.5 mg, i.m., ECP®, Pfizer Animal Health, Brazil) on d9 and TAI 48h after CIDR withdraw. Heifers from group AI were considered to have responded to the estrus synchronization protocol if they were detected in estrus within 6 days after CIDR® withdraw and were AI 12h after estrus detection (60,4 %, $n=125/207$). All heifers were bred by the same 2 technicians and the same frozen-thawed bull semen was used. Pregnancy diagnoses were performed by transrectal ultrasonography (Aloka SSD 500V; with a 7.5 MHz linear-array intrarectal transducer) 30 days after TAI.

2.2. Blood Samples and Progesterone RIA analyses

Experiment 1

Blood samples for progesterone (P4) analyses were collected from a coccygeal vessel into Vacutainer tubes (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Blood was allowed to clot at 4°C for 24 h and centrifuged at 1500 x g for 15 minutes at room temperature. Serum was removed and frozen at -20°C until assays were performed. Serum P4 concentrations were determined using a solid-phase radioimmunoassay kit containing antibody-coated tubes and 125I-labelled progesterone (Coat-a-count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) according to the manufacturer's instructions. The intra-assay coefficients of variation were 6.7 % and 8.5 %, for assays 1 (d0) and 2 (d7), respectively and coefficient inter-assay was 5.4 %. Sensitivity was 0.01 ng/ml.

2.3. Statistical Analyses

Experiment 1

Continuous variables were analyzed by least square procedure of variance (PROC GLM, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Each variable was tested for normality of residues (Kolmogorov-Smirnov

test) and homogeneity of variances (Brow-Forsythe test). Progesterone concentrations on days 0 and 7 were transformed by log₁₀. The comparison of least square means of these variables was performed using the Tukey-Kramer test. In the model to evaluate the serum progesterone concentrations on day 7 were included the effects of CIDR number of uses, and progesterone concentration on days 0 (co-variable). In the model to evaluate diameter of dominant follicle were included the effects of CIDR® number of uses, progesterone concentration on days 0 and 7 (co-variable), BCS (co-variable), and interaction between CIDR number of uses and progesterone concentrations on days 0 and 7.

Dependent binomial variables [ovulation (included heifers already ovulated at TAI + heifers ovulated between TAI and 48h latter), synchronization (heifers ovulated between TAI and 48h latter), conception of synchronized heifers and pregnancy rates] were analyzed by logistic regression (PROC LOGISTIC, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences between follicle classes were analyzed by Bom-Ferroni method, unless to percentages were inferior to 20%, in this case, Fishers exact test (PROC FREQ, SAS) was performed. The effect of CIDR number of use was tested on all binomial data and effect of AI technician was tested on conception of synchronized heifers and pregnancy rates. The effects of serum progesterone concentrations on days 0 and 7 and BCS were included in the models of all binomial data as co-variables. The maximum follicular diameter at TAI was included in the model of synchronization and conception rates as co-variable. When the effect of maximum follicular diameter at TAI was detected (on synchronization and conception rates), follicles were divided into 3 different intervals based on classes of diameter previously described by Gimenes et al. (2007), follicles smaller than 8.5 mm (Class 1), between 8.5 and 10 mm (Class 2) and larger than 10 mm (Class 3), and the effect of these classes of follicles was reanalyzed. Pregnancy rate was analyzed with the model described for ovulation rate, including the effect of AI technician.

At the time of TAI, an ovary image of multiple follicles smaller than 6 mm was observed in 62 heifers (for 1st use CIDR devices: 25 heifers, for 2nd use CIDR devices: 19 heifers and for 3rd use CIDR devices: 18 heifers). For the physiological discussion of this *experiment* (synchronization and conception of synchronized heifers rates), these heifers were excluded from the analysis, because of the interest in analyzing the effect of maximum follicular size at TAI, but ovulation and pregnancy rates included these heifers.

The data were reanalyzed after removing effects of interactions and/or co-variables from the model that accounted for no significance. Probability values of $\alpha \leq 0.05$ were considered significant in all cases. Probability values of $0.05 < \alpha \leq 0.1$ were considered to be a tendency.

Experiment 2

Pregnancy rate after TAI and conception rate after AI were analyzed by logistic regression (PROC LOGISTIC, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Were included on the models the effects of CIDR number of uses, AI technician, moment of PGF_{2 α} administration, eCG, and interactions. The data were reanalyzed after removing effects of interactions and/or co-variables from the model that accounted for no significance. Probability values of $\alpha \leq 0.05$ were considered significant in all cases. Probability values of $0.05 < \alpha \leq 0.1$ were considered to be a tendency.

Results

Experiment 1

At initiation of the synchronization protocol, increased endogenous serum progesterone concentration increased maximum follicular diameter at TAI (Figure 3. $P < 0.05$), conception (Figure 4. $P < 0.05$) and pregnancy rates (Figure 5. $P < 0.05$).

A treatment (CIDR number of uses) effect was detected for progesterone concentration on day 7. Heifers treated with 1st use CIDR devices had greater progesterone concentration on day 7 compared with heifer treated with 3rd use CIDR devices (Table 1). Progesterone concentration on day 7 per se, however, did not affect any of studied parameters.

An effect of treatment (CIDR number of uses) was also detected for maximum follicular diameter at TAI. Heifers treated with 3rd use CIDR devices had larger follicles than heifers treated with 1st use CIDR devices and tended to have larger follicles than heifers treated with 2nd use CIDR devices (Table 1).

Maximum size of follicular diameter at TAI was positively correlated with synchronization (Figure 6; $P < 0.05$) and conception rates (Figure 7; $P < 0.05$).

Synchronization and conception rates were affected by follicular diameter classes. Heifers which follicles were larger than 10 mm had better synchronization and conception rates compared with heifers with smaller follicles (Table 2; $P < 0.05$).

Heifers treated with 3rd use CIDR devices tended to have better conception rates than heifers treated with 1st and 2nd use devices, regardless of maximum follicular size at TAI (Table 3). Maximum follicular diameter at TAI classes positively affected conception rates within 1st and 2nd use CIDR devices treatments (CIDR number of uses). Heifers which follicles were larger than 10 mm, had better synchronization and conception rates compared with heifers with smaller follicles. For heifers treated with 3rd use devices, however, no effect of maximum follicular diameter at TAI classes was detected (Table 3).

Heifers treated with 3rd use CIDR devices also had better pregnancy rate to TAI than heifers treated with 1st and 2nd use CIDR devices (Table 1).

Experiment 2

In TAI heifers, a CIDR by eCG treatment interaction was detected for pregnancy rates. The administration of eCG increased pregnancy rates in heifers treated with 1st use CIDR devices ($P < 0.05$), tended to increased pregnancy rates in heifers treated with 2nd use CIDR devices ($P < 0.1$), but had no impact in heifers treated with 3rd use CIDR devices. The eCG also enhanced pregnancy rates in heifers that received PGF_{2α} on day 9, but not on day 7 (PGF_{2α} by eCG interaction, Table 4).

In heifers AI after estrous detection, however, no treatment effect (CIDR number of uses, moment of PGF_{2α} administration and eCG) was detected (Table 4).

Discussion

The first experiment was designed to evaluate if serum progesterone concentrations at beginning of protocol or at the time of deviation would affect results to TAI. The serum progesterone concentrations on day 7 of the protocol decreased as CIDR number of uses increased (Table 1). Because of the random distribution of heifers with CL or not at this moment, the difference could be explained by CIDR previous length of use.

It was demonstrated that conception and pregnancy rates for synchronized heifers were enhanced when heifers had higher concentration of progesterone on day 0 and were treated with 3rd use CIDR, also showing larger follicles.

The larger size of follicles at TAI for heifers treated with 3rd use CIDR devices is possibly related to lower serum progesterone concentration at the end of treatment (between d7 to 9), after induction of luteolysis on day 7. In the present trial, serum progesterone concentration was not evaluated on day 9 (because it was not in our working hypotheses), but previous study reported progesterone concentration of 1 ng/ml, on the 25^o day of continuous treatment with CIDR devices in heifers (Santos et al., 2004). For heifers synchronized with 3rd use of CIDR, those devices would have 25 days of previous use on day 7 of the protocol and progesterone concentrations were probably low. For the positive effect of higher progesterone concentration on day 0 on dominant follicle diameter, although apparently controversial to the positive effect of 3rd use CIDR devices, the effect explanation is probably the same because when progesterone is greater in the beginning of treatment (day 0 of protocol = days 6 to 15 of estrous cycle) it is potentially low in its end (day 7 of protocol = day 14 till end of estrous cycle). The low progesterone concentration possibly enhanced LH pulses (Rahe et al., 1980), after natural luteolysis occurred, increasing maximum follicular diameter at TAI (Ginther et al., 1996).

Rahe et al. (1980) reported an inverse relationship between progesterone concentration and LH pulses. During luteal phase, when progesterone concentration was 5 to 8 ng/ml, LH pulses frequency was low, 1 pulse each 4 h, however, when progesterone concentrations decreased to 1 to 2 ng/ml, LH pulses frequency increased to 1 or more pulses each 2 h. In addition, Ginther et al. (1996) observed a positive relationship between LH pulses frequency and dominant follicle size. Even if LH pulsatility was not

evaluated on this trial, the data reported indicates that increased size of largest follicle at TAI in heifers with greater serum concentration of progesterone on day 0 and heifers treated with 3rd use CIDR®, could be explained by the effect of low progesterone concentration increasing LH pulses frequency and consequently follicular diameter.

Maximum follicular diameter at TAI had a positive influence on synchronization rate, regardless of treatment. Even if reported diameter at follicle deviation in Nellore heifers is 5.7 to 6.2 mm (Sartoreli et al., 2005, Gimenes et al., 2007), ovulation capacity increase as follicular diameter increases. Gimenes et al. (2007) reported ovulation rates of 33 %, 3/9, for follicles ranging 7.0 to 8.4mm (average: 7.6 mm), 80 %, 8/10, for follicles of 8.5 to 10.0mm (average 9.6 mm) and 90 %, 9/10, for follicles larger than 10 mm (average 10.9 mm). In the present study, follicles at TAI for synchronized heifers were larger (11.3 ± 2.0 mm) than for heifers that did not synchronize (8.8 ± 1.4 mm). Follicles acquire ovulatory capacity soon after deviation, however, high doses of LH are necessary for ovulation to occur (Sartori et al, 2001). As dominant follicle grows, granulosa cell LH receptors synthesis (Bao et al, 1997) and cAMP activity increases (Jolly et al., 1994), enhancing ovulatory capacity (Sartori et al, 2001). This is a possible explanation to the detected effect of follicle size on synchronization rate.

Maximum follicular diameter at TAI also affected conception of synchronized heifers. This data is similar to that described by Perry et al. (2007) in which heifers that ovulated follicles < 10.7 mm in diameter had decreased pregnancy rates compared with heifers that ovulated follicles ≥ 12.8 mm, indicating that oocyte competence, postovulation progesterone production by the CL, and the uterine environment may all be involved in the decrease of pregnancy rates.

During regular estrous cycle, maturation of dominant follicle initiates during proestrus when progesterone concentration is lower than 1 ng/ml (Stok e Fortune, 1993). During proestrus as progesterone decreases, LH pulses followed by estradiol concentration increase because of follicular maturation. In experiment 1, heifers treated with 3rd use CIDR were possibly in this condition. It could be suggested that these heifers initiated proestrus earlier during treatment, and that proestrus length was probably a factor that affected conception rates in the present study.

The influence of proestrus length on fertility was previously evaluated in dairy (Peters and Pursley, 2003) and beef cows (Mussard et al., 2007) through modification of the interval from PGF_{2α} to the induction of ovulation with GnRH. In dairy cows, Peters and Pursley (2003) reported larger follicular size and greater conception rates for animals with a 48 h interval from PGF_{2α} to GnRH than when GnRH was given at the same time as PGF_{2α}. Mussard et al. (2007) reported greater conception rates in beef cows AI after estrous detection compared with conception rates of ovulated cows TAI 12h after 10 mm follicles were induced to ovulate with GnRH.

Schmitt et al. (1996) evaluated conception in dairy heifers after TAI (25.8 %) vs. AI after estrus detection (57.5 %) and suggested that the reduced conception rates in heifers in the TAI group occurred mainly because of short estrous cycles, that could be related to delayed growth of preovulatory follicles and induction of LH surge early in the development of the preovulatory follicle, that could produce a CL with a reduced life span. Delaying the second GnRH resulted in no difference in pregnancy rate compared with the AIE group. Pursley et al. (1997) compared conception to AI after estrus detection in heifers synchronized with PGF_{2α} injection vs. Ovsynch, and detected that the pregnancy rates per AI were greater for control heifers (74.4 %) than for heifers treated with Ovsynch (35.1 %) and suggested that the fixed time AI was not effective for heifers because of the lack of synchronization. Sartori et al. (2004) compared ovarian function between nulliparous heifers and lactating Holstein cows and detected that maximal serum progesterone concentration was lower for cows than for heifers. In cattle, the increase in LH pulse frequency and baseline concentrations, measured between CL regression and the preovulatory surge of LH, may enhance follicular maturity (Rahe et al., 1980). In general, conception rates increased as pre-ovulatory follicle increased. Previous studies reported a directly relationship between DF diameter and subsequent CL diameter (Vasconcelos et al, 2001, Sá Filho et al, 2005), between CL volume and serum progesterone concentrations (Vasconcelos et al, 2001) and between progesterone concentrations and fertility (Vasconcelos et al, 2001, Sá Filho et al, 2005). It has been reported (Perry et al., 2005) that GnRH-induced ovulation of 11 mm follicles resulted in lower pregnancy rates (18 to 29 %) and greater embryonic mortality rate (39 %) between approximately 27 and 68 d after AI, but animals that spontaneously ovulated follicles < 11 mm had similar fertility and embryonic mortality as animals that ovulated larger follicles after AI. The occurrence of estrus seems to reduce the impact of immature follicles ovulation. These data

indicate that synchronization protocol may have some negative effect on conception in heifers, that is been corrected by estrus. This may be related with high progesterone in heifers with reduced proestrus at TAI.

In experiment 2, our working hypothesis is that low conception in Nellore heifers to TAI protocol is due to reduced proestrus. PGF_{2α} injection on day 7 of the protocol with 3rd use CIDR devices will decrease progesterone concentrations increasing LH and eCG treatment could restore fertility to TAI, by increasing LH. In heifers bred after estrus detection, conception will not be affected.

In experiment 2 for heifers that were TAI, eCG treatment improved pregnancy rates in heifer treated with PGF_{2α} on day 9 and in heifers treated with 1st and 2nd uses of CIDR devices. The moment of PGF_{2α} administration can alter the progesterone concentrations during the end of the protocol. We suggest that possible lower progesterone concentrations in heifers that PGF_{2α} was administered on day 7, probably promoted an increase in LH pulses and the initiation of proestrus occurring earlier, as in heifers treated with eCG and with 1st and 2nd uses of CIDR devices. The use of eCG could somehow reduced the impact of short proestrus length, probably by enhancing the gonadotrophin support to ovulatory follicle, what occurs naturally during proestrus. There is some evidence on increase of progesterone production when eCG is used at time of progesterone devices removal (Marques et al., 2003).

In heifers that were AI after estrous detection, even if treated with the same protocol of TAI, conception was not influenced by CIDR previous length of use, moment of PGF_{2α} administration or eCG treatment. These data are similar to Perry et al. (2007) in which size of the ovulatory follicle at the time of insemination had no effect on pregnancy rates when cows ovulated spontaneously after detection of standing estrus. Heifers ovulating spontaneously had larger ovulatory follicles at insemination than heifers induced to ovulate with GnRH.

Data from the two experiments indicates that greater progesterone concentrations before TAI may decrease conception because of shorter proestrus length or inadequate time of TAI (not evaluated in this study) and that AI after estrus detection was greater because of longer proestrus length or correct moment of AI.

References

- Bao, B., Garverick, HA, Smith, GW, Smith, MF., Salfen, BE, Youngquist, RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 1997, 56, 1158-1168.
- Geary, T. W., J. C. Whittier, and D. G. Lefever. 1998. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or Co-Synch protocol. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl.1): 278.
- Gimenes, L.U., Carvalho, N.A.T., Sá Filho, M.F., Ayres, H., Torres-júnior, J.R.S., Souza, A. H., Bó, G.A., Barros, C.M., Sartorelli, E.S., Baruselli, P.S. E Mapletoft, R.J. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos Indicus* heifers. *Journal of reproduction and fertility*, 2007 (suppl 1), 242, abstract 251.
- Ginther O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-94, 1996.
- Jolly, P.D., Tisdal, D.J., Heath, D.A., Lun, S., McNatty, K.P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cycling adenosine 3', 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol. Reprod.*, 1994, 51, 934-944.
- Lamb, G.C., Larson, J.E., Geary, T.W., Stevenson, J.S., Johnson, S.K., Day, M.L., Ansotegui, R.P., Kesler, D.J., DeJarnette, J.N., Landblom, D. Synchronization of estrous and artificial insemination in replacement beef heifers using GnRH, PGF2 α and progesterone. *J. Anim. Sci.*, 2006, 84, 3000-3009.
- Lamb, G.C.; Nix, D.W.; Stevenson, J.S.; Corah, L.R. Prolonging MGA-prostaglandin F2 interval from 17 to 19 days in estrus synchronization system for heifers. *Theriogenology*, 2000, 53, 691-698.
- Lowman, B.G., Scott, N., Somerville, S. Condition scoring of cattle. *Bulletin East Scotland College Agriculture*, 1996, n°6.
- Marques, M.O., Reis, E.L., Campos Filho, E.P., Baruselli, P.S., 2003. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: *Proceedings 5° Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina, pp. 392 (abstract).
- Murphy, M. G.; Martinuk, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine reviews.*, v. 12, p. 27-44, 1991.

Mussard M. L., Burke C. R., Behlke E. J., Gasser C. L., and Day M. L.. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci*, 2007, 85: 937-943.

Paterson, D.J., Kojima, F.N., Smith, M.F. A review of methods to synchronize estrous in replacement beef heifers and post-partum cows. *J. Anim. Sci.*, 2003 81, (Suppl.2), E166-177. Online available: www.asas.org/symphosia/03esupp2/jass2402.pdf.

Perry G. A., Smith M. F., Roberts A. J., MacNeil M. D., and Geary T. W.. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*, 2007, 85: 684-689.

Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, and T. W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:5268-5273.

Peters, M. W., and J. R. Pursley. 2003. Timing of final GnRH and the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology* 60:1197-1204.

Pinheiro, O.L., Barros, C.M., Figueredo, R.A., Valle, E.R., Encarnação, R.O. Padovani, C.R. Estrous behavior and estrous to ovulation interval in Nellore cattle *Bos indicus* with natural estrous or estrous induced with prostaglandin or norgestomet and estradiol valerate, *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.

Pursley J. R., Wiltbank M. C., Stevenson J. S., Ottobre J. S., Garverick H. A., and Anderson L. L.. Pregnancy Rates Per Artificial Insemination for Cows and Heifers Inseminated at a Synchronized Ovulation or Synchronized Estrus. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 295-300.

Pursley, J.R., Silcox R.W. and Wiltbank M.C.. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.81, p.2139-2144, 1998.

Pursley, J.R.M. Mee O., and Wiltbank M.C.. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 1995, 44, 915–923.

Rahe, C.H., Owens, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.J., Harms, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, 1980, 107, 498-503.

Sá Filho, OG, Vasconcelos, JLM, Santos, RM, Oba, E, Perez, GC. Effects of PGF 2 alfa in fixed time embryo transfer protocol on synchronization and conception rates in IVF fresh embryo recipients. *Journal of Animal Science (Suppl 1)*, 2005, 83, 168 (Abstract)

Santos, R. M.; Vasconcelos, J. L. M.; Perez, G. C.; Maciel, A. B. B.; Sá Filho, O. G. Serum progesterone concentrations in Nelore x Angus heifers treated with 1.38-g or 1.9-g CIDR devices. *Journal of Animal Science (Suppl. 1)*, 82, 370, 2004 (Abstract).

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

Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C.P., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity an bovine follicles. *Biol Reprod.*, 2001, 65, 1203-1409.

Sartori, R.; Haughian, J.M.; Shaver, R.D., Rosa, G.J.M.; Wiltbank, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci., Champaign*, v.87, p. 905-920, 2004.

Schmitt, EJP, Diaz, T, Drost, M., Tatcher, WW. Use of gonadotropin-releasing hormone agonist or humam chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science*, 1996, 74, 1084-1091.

Stock, A.E.; Fortune, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 1993, 132, 1108-14.

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

Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.J., Pursley, J.R., and Wiltbank, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of estrous cycle in lacting dairy cows. *Theriogenology*, 1999, 52, 1067, 1999.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Experimental design schedule: ultrasound exams for evaluation of cyclicity (US1), measurement of maximum follicular diameter (US2), ovulation (US3) and pregnancy diagnoses (US4), blood samples to evaluate influence of progesterone concentration at initiation of treatments and/or on day 7 of protocol of TAI results. Body condition score was evaluated (BCS). The base protocol consisted of administration of EB and a CIDR (D0), an injection of PGF2 α (D7), CIDR withdraw plus an ECP administration (D9), TAI (D11). Treatments differ in CIDR previous length of use – 1st use – no previous use, 2nd use, 9d of previous use or 3rd use, 18d of previous use.

Figure 2: Experimental design schedule: estrous detection for evaluation of cyclicity (d -21 a d0). Body condition score was evaluated (BCS). The base protocol consisted of administration of EB (2 mg, i.m.) and a CIDR (1st use CIDR, no previous use, 2nd use CIDR, 9d of previous use or 3rd use CIDR, 18d of previous use, d0), PGF2 α on day 7 or day 9, CIDR withdraw plus, ECP (D9) and eCG (0 UI vs.300 UI) or no further treatment (D9), TAI (D11) or AI after estrous detection within 6 days after CIDR withdraw, pregnancy diagnoses (D41).

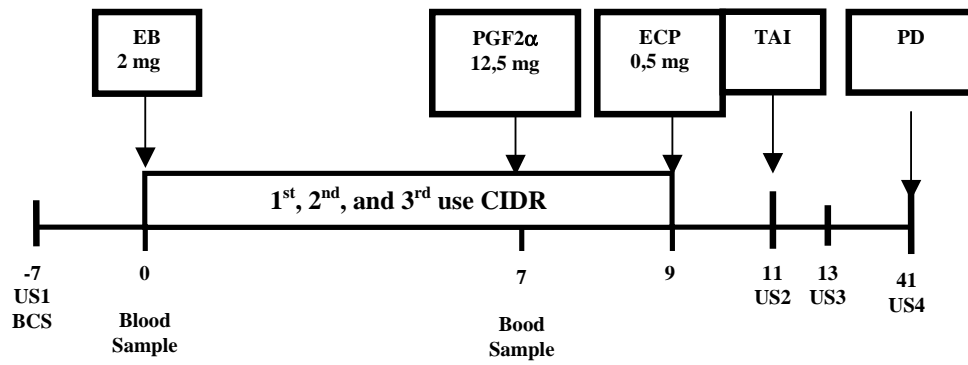
Figure 3: Graphic representation of maximum follicular diameter at TAI related to serum progesterone concentration at initiation of a synchronization protocol (day 0, $P < 0.05$). Botucatu - SP. 2007.

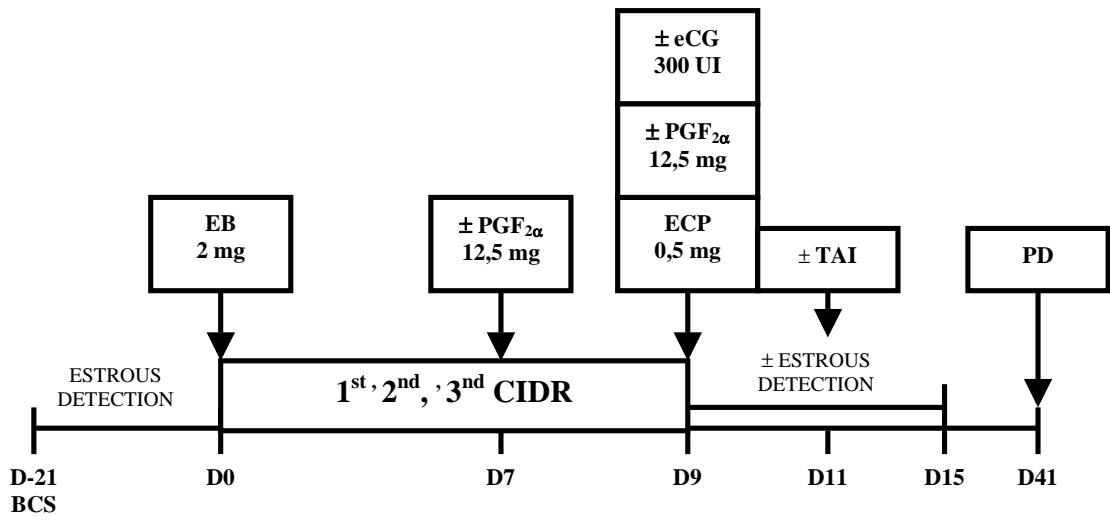
Figure 4: Graphic representation of the probability of conception to TAI in heifers synchronized to the protocol related to serum progesterone concentration at initiation of a synchronization protocol (day 0, $P < 0.05$). Botucatu - SP. 2007.

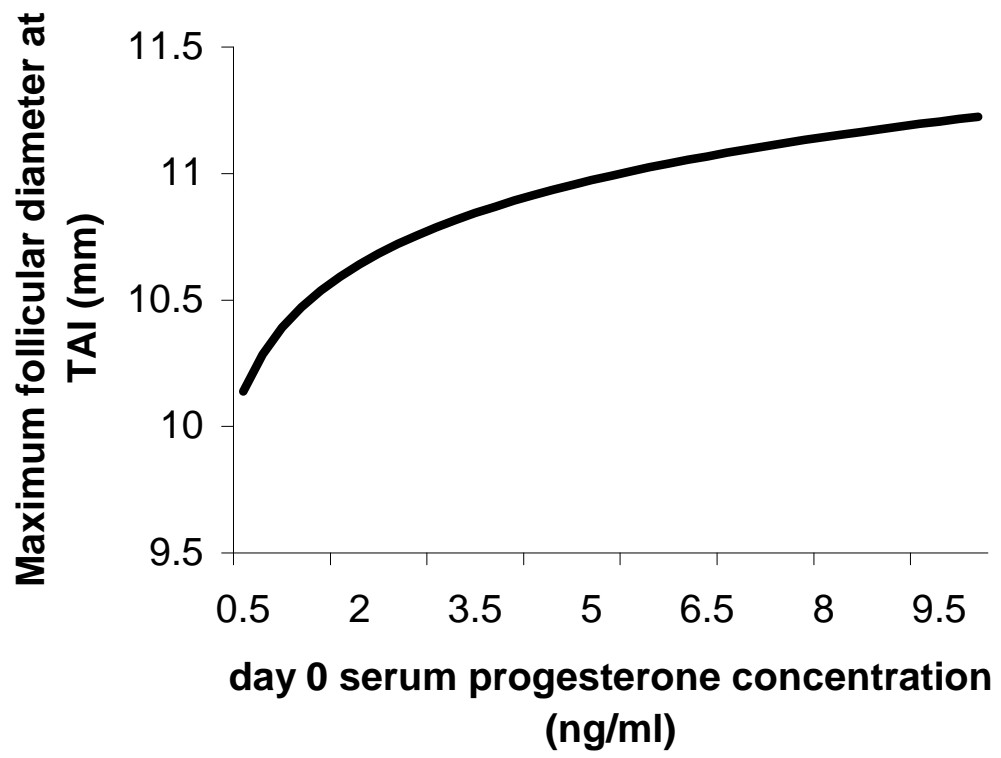
Figure 5: Graphic representation of the probability of pregnancy to TAI related to serum progesterone concentration at initiation of a synchronization protocol (day 0, $P < 0.05$). Botucatu - SP. 2007.

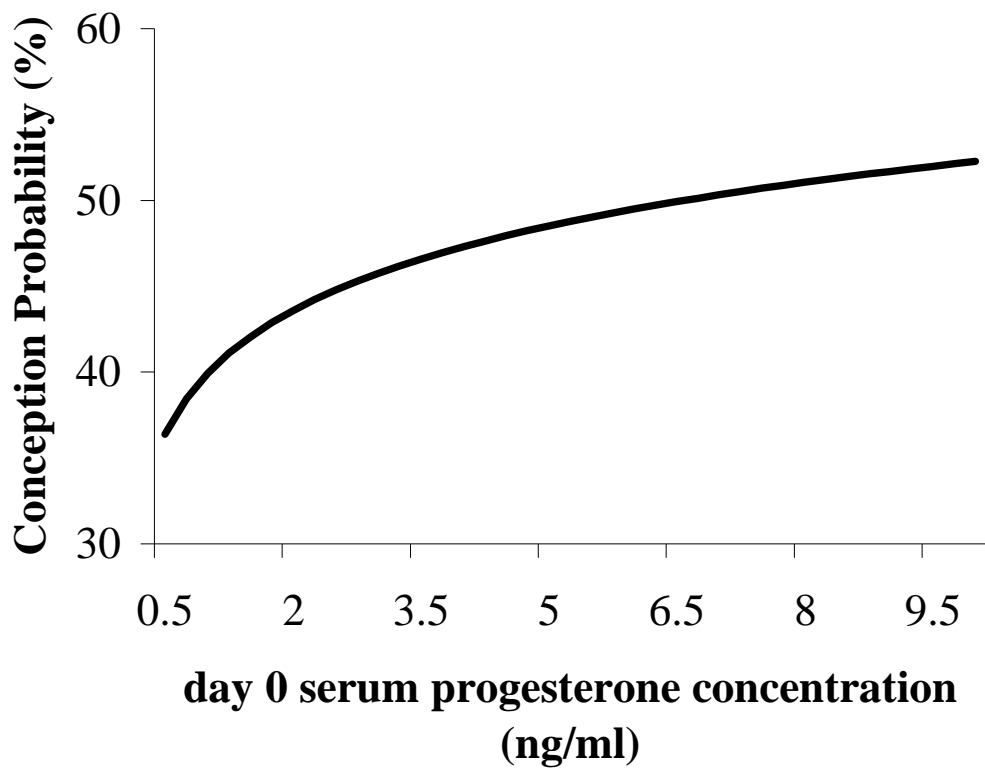
Figure 5: Graphic representation of the probability of synchronization to the protocol related maximum follicular diameter at TAI ($P < 0.05$). Botucatu - SP. 2007.

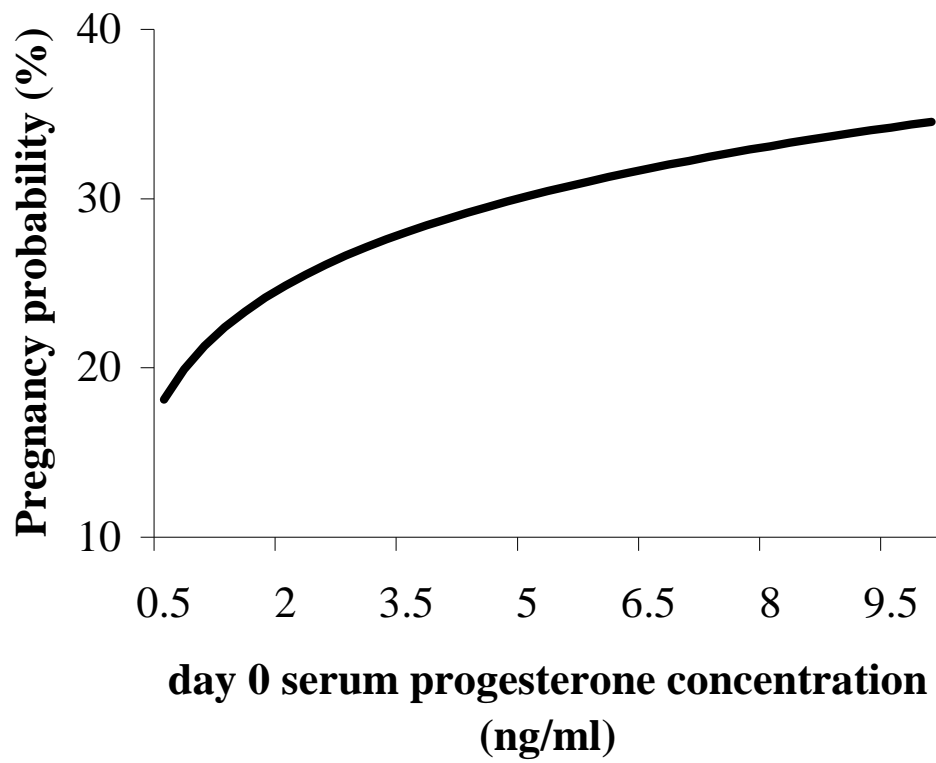
Figure 6: Graphic representation of the probability of conception to TAI in heifers synchronized to the protocol related to maximum follicular diameter at TAI ($P < 0.05$). Botucatu - SP. 2007.

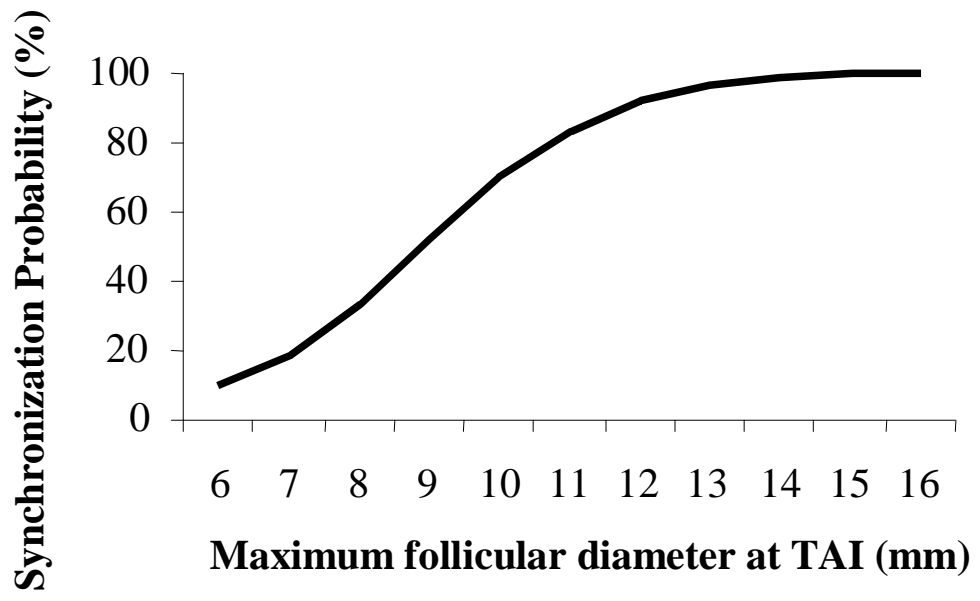












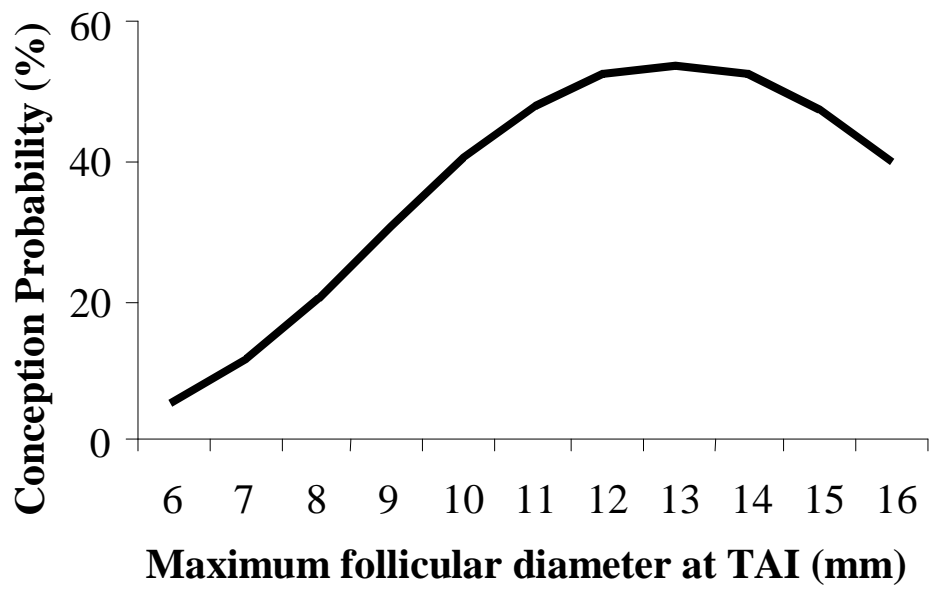


Table 1: Serum progesterone concentrations on day 7, maximum follicular diameter at TAI, ovulation, synchronization, conception (synchronized heifers) and pregnancy rates related to CIDR treatments.

CIDR Treatments	Serum [P4D7]	Max. Fol. Dim. at TAI (mm)	Ovulation Rate, %	Synchronization Rate, %	Conception Rate, %	Pregnancy Rate, %
1 st use	3.0 ± 1.9 ^A	10.1 ± 2.0 ^{A, a} (121)	70.5 ^A (103/146)	64.5 ^A (78/121)	37.2 ^a (29/78)	20.5 ^A (30/146)
2 nd use	2.3 ± 1.6 ^{A,B}	10.6 ± 2.3 ^{A,B, b} (109)	72.7 ^A (93/128)	67.9 ^A (74/109)	37.8 ^a (28/74)	22.7 ^A (29/128)
3 rd use	2.0 ± 1.2 ^B	11.0 ± 2.1 ^{B, b} (106)	78.2 ^A (97/124)	74.5 ^A (79/106)	53.2 ^b (42/79)	35.5 ^B (44/124)
TOTAL	2.5 ± 1.6	10.5 ± 2.2 (336)	73.6 (293/398)	68.7 (231/336)	42.9 (99/231)	29.5 (99/336)

^{A,B} Values with different superscripts within a column are different ($P < 0.05$).

^{a,b} Values with different superscripts within a column tended to differ ($P < 0.1$).

Means described in table 1 are raw means

1st use CIDR treatment = CIDR devices with no previous use.

2nd use CIDR treatment = CIDR devices with 9 days of previous use.

3rd use CIDR treatment = CIDR devices with 18 days of previous use.

Serum [P4D7] = progesterone serum concentrations on day 7 of protocol

Max. Fol. Dim. at TAI = raw means plus standard deviation for maximum follicular diameter at TAI

Ovulation rate = ovulation rate for all heifers, including heifers that ovulated between CIDR removal and TAI and within 48 h after TAI.

Synchronization rate = synchronization rate for heifers witch maximum follicular diameter could be accessed at TAI

Conception rate = conception rate for heifers that ovulated to the synchronization protocol within 48 h after TAI.

Pregnancy rate = pregnancy rate for all heifers treated with synchronization protocol.

Table 2: Synchronization and conception rates (synchronized heifers) related to maximum size follicular diameter at TAI classes. Botucatu - SP. 2007.

Variable	Class 1: < 8.5 mm	Class 2: $8.5 \leq X \leq 10.0$ mm	Class 3: > 10.0 mm	P Value
SR %	28.2 (20/71) ^a	62.5 (70/112) ^b	92.2 (141/153) ^c	< 0.05
CR %	15.0 (3/20) ^a	32.9 (23/70) ^a	51.8 (73/141) ^b	< 0.05

^{a, b, c} Values with different superscripts within a row are different. ($P < 0.05$)

Class = Classification of maximum diameter follicle at TAI.

Class 1 = Heifers with follicles < 8.5 mm at TAI

Class 2 = Heifers with follicles between 8.5 mm and 10.0 mm at TAI

Class 3 = Heifers with follicles > 10.0 mm at TAI

SR = synchronization rate for heifers with maximum follicular diameter could be accessed at TAI

CR = conception rate for heifers that ovulated to the synchronization protocol within 48 h after TAI.

Table 3: Conception rates (synchronized heifers) related to maximum size follicular diameter at TAI classes within each CIDR treatment. Botucatu - SP. 2007.

CIDR Treatments	Conception Rates, %			P Value
	Class 1: < 8.5 mm	Class 2: 8.5 ≤ X ≤ 10.0 mm	Class 3: > 10.0 mm	
1 st use	9.1 (1/11) ^a	24.0 (6/25) ^a	52.4 (22/42) ^b	< 0.05
2 nd use	0 (0/4) ^a	21.7 (5/23) ^a	48.9 (23/47) ^b	< 0.05
3 rd use	40.0 (2/5) ^a	54.5 (12/22) ^a	53.8 (28/52) ^a	> 0,10

^{a, b} Values with different superscripts within a row are different ($P < 0.05$).

Class = Classification of maximum diameter follicle at TAI.

Conception rates = conception rates for heifers that ovulated to the synchronization protocol within 48 h after TAI.

1st use CIDR treatment = CIDR devices with no previous use.

2nd use CIDR treatment = CIDR devices with 9 days of previous use.

3rd use CIDR treatment = CIDR devices with 18 days of previous use.

Class 1 = Heifers with follicles < 8.5 mm at TAI

Class 2 = Heifers with follicles between 8.5 mm and 10.0 mm at TAI

Class 3 = Heifers with follicles > 10.0 mm at TAI

Table 4: Pregnancy rate for TAI heifers and conception after estrus detection in Nellore heifers after synchronization protocol, with PGF_{2α} on d7 vs d9, with or without an eCG administration by CIDR treatments.

Treatments	Pregnancy at TAI, %		Conception after estrous detection, %	
	Without eCG	With eCG	Without eCG	With eCG
D7 PGF_{2a}	33.3 (16/48) ^A	40.4 (21/52) ^A	69.0 (20/29) ^A	51.5 (17/33) ^A
D9 PGF_{2a}	26.4 (14/53) ^A	50.0 (23/46) ^B	66.7 (22/33) ^A	73.3 (22/30) ^A

CIDR	Pregnancy at TAI, %		Conception after estrous detection, %	
	Without eCG	With eCG	Without eCG	With eCG
1st use	21.9 (7/32) ^A	50.0 (18/36) ^B	75.0 (12/16) ^A	75.0 (12/16) ^A
2nd use	24.3 (9/37) ^a	42.4 (14/33) ^b	66.7 (20/30) ^A	61.5 (16/26) ^A
3rd use	43.7 (14/32) ^A	41.4 (12/29) ^A	62.5 (10/16) ^A	52.4 (11/21) ^A

CIDR	Pregnancy at TAI, %		Conception after estrous detection, %	
	D7 PGF _{2a}	D9 PGF _{2a}	D7 PGF _{2a}	D9 PGF _{2a}
1st use	35.7 (15/42) ^A	38.5 (10/26) ^A	68.7 (11/16) ^A	81.2 (13/16) ^A
2nd use	35.5 (11/31) ^A	30.8 (12/39) ^A	61.3 (19/31) ^A	68.0 (17/25) ^A
3rd use	40.8 (11/27) ^A	44.1 (15/34) ^A	46.7 (7/15) ^A	63.6 (14/22) ^A

^{A,B} Values for the same variable with different superscripts within a row are different ($P < 0.05$).

^{a,b} Values for the same variable with different superscripts within a row tended to differ ($P < 0.1$).

D7 PGF_{2α} treatment = PGF_{2α} (12,5 mg, i.m.) treatment on day 7 of synchronization protocol

D9 PGF_{2α} treatment = PGF_{2α} (12,5 mg, i.m.) treatment on day 9 of synchronization protocol

eCG treatment = eCG treatment (300 IU) on day 9 of synchronization protocol.

1st use CIDR treatment = CIDR devices with no previous use.

2nd use CIDR treatment = CIDR devices with 9 days of previous use.

3rd use CIDR treatment = CIDR devices with 18 days of previous use.

Pregnancy rate to TAI = pregnancy rate for TAI heifers treated with synchronization protocol.

Conception after estrous detection = conception rates for heifers artificial inseminated after estrous detection after protocol.