

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

Efeitos das concentrações de progesterona, duração do proestro e diâmetro folicular sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore submetidas à inseminação artificial após detecção do estro ou inseminadas em tempo fixo.

THIAGO MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Novembro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

Efeitos das concentrações de progesterona, duração do proestro e diâmetro folicular sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore submetidas à inseminação artificial após detecção do estro ou inseminadas em tempo fixo.

THIAGO MARTINS

Médico Veterinário

Orientador: Prof. Ass. Dr José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Novembro – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA  
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Martins, Thiago, 1983-

M386e Efeitos das concentrações de progesterona, duração do proestro e diâmetro folicular sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore submetidas à inseminação artificial após detecção de estro ou inseminadas em tempo fixo / Thiago

Martins. - Botucatu : [s.n.], 2011

viii, 84 f. : tabs., ils., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2011

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

Inclui bibliografia

1. Progesterona. 2. Novilhas Nelore. 3. Proestro. 4.

IATF. I. Vasconcelos, José Luiz Moraes. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais **ISRAEL MARTINS** e **NORMA HELENA ALVES LACERDA MARTINS**, pelos exemplos de humildade, honestidade e perseverança, pelo amor incondicional e por, sempre, me apoiarem na realização dos meus objetivos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre comigo, me ajudando em todas etapas de minha vida.

Aos meus pais pela educação, dedicação e apoio em todas as decisões que tomei durante a minha vida.

A toda minha família, especialmente, as minhas tias Bia e Suely pelo incentivo;

Ao meu amigo e orientador Prof. Zequinha pela oportunidade, pelos conselhos, pelo amadurecimento, pela rigidez e por, sempre, ter sido um exemplo de que podemos ir além.

Ao meu grande amigo Rogério pela confiança depositada, pelo incentivo, pelo aprendizado e pelo exemplo de dedicação e empenho.

Aos amigos de Pós-Graduação Adnan, Augusto, Fernanda, Fernando, Lucas e Marcos pelos ensinamentos, convívio e distrações proporcionados.

Aos amigos veterinários Everton e Hugo pela ajuda nos experimentos 1 e 2, e pelos bons momentos proporcionados durante o período que estive na fazenda.

Ao amigo zootecnista Otto pela ajuda no experimento 1, pelo incentivo e pelo convívio ao longo da minha permanência na Fazenda Raça.

Ao Adnan, pelo auxílio na execução dos experimentos 1 e 2, pela ajuda na análise estatística e pelas sugestões pertinentes ao trabalho.

Ao Fernando, pelo auxílio na execução do experimento 3.

À Agropecuária Fazenda Brasil, em nome do Rogério, e às Fazendas Palotina e Forquilha, em nome do Sidney, por permitirem a realização dos experimentos.

Aos vaqueiros das Fazendas, que foram essenciais para realização desses experimentos, pela amizade e momentos de muita risada durante o período que estive

nas Fazendas: Tonhão, José Carlos (Zé), Doro, Galego, Bigode, Bico, Marcinho, Ronaldo, Toquinha, Vilsivan, Cowboy, Baxinho, Cabana, Jefferson e Gilberto.

Aos demais moradores da Fazenda Rio Correntes (Agropecuária Brasil), em especial à Marli, Paulo, Célia, Josias, Catarina e suas famílias pelas pessoas boas que são e por, sempre, estarem dispostos a ajudar.

Aos estagiários: Paulo, Marcela, Géssica, Artur, Mundim, Daniel, Eraldo, Vitor, Adriana e Augusto pela amizade, convívio e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Professor Reinaldo Cooke pela ajuda na análise estatística.

À Devani (UNESP – Araçatuba), pela realização de todas as dosagens de progesterona apresentadas nessa Dissertação.

À Pfizer Saúde Animal, em nome de Fernanda Hoe, Mauro Meneghetti e Ocilon por terem cedido a maioria dos produtos utilizados nos experimentos realizados nessa dissertação e pela confiança depositada.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

À fmva-UNESP Araçatuba pela formação proporcionada.

A todos os professores do departamento de Reprodução Animal da fmvz-UNESP Botucatu, pelos ensinamentos ministrados ao longo da minha residência.

Aos Professores Dr. José Buratini Júnior e Dr. Pietro Sampaio Baruselli por participarem da banca do Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões pertinentes ao trabalho.

Aos Professores Dr. Roberto Sartori Filho e Dr. Guilherme de Paula Nogueira por participarem da banca de Defesa e pelas sugestões pertinentes ao trabalho.

A todos os meus amigos da fmva-UNESP Araçatuba e a 14ª turma de Medicina Veterinária pelos excelentes momentos vividos.

A todos os amigos que fiz em Botucatu, em especial Gustavo Pollicarpo e Vieira Junior (Brachiaria).

À Cecília pelo incentivo, carinho e ajuda nas correções de gramática.

Aos técnicos da Seção de Graduação ou Pós-Graduação da UNESP–Botucatu: Solange, Seila, Barbosa e Carlos por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às novilhas utilizadas nesse estudo, pela quantidade de informação disponibilizada.

E a todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

**Obrigado a todos!**

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades, Muda-se o ser, muda-se a confiança; Todo o mundo é composto de mudança, Tomando sempre novas qualidades”.*

*Luís de Camões*

*“Você não consegue ligar os pontos olhando pra frente; você só consegue ligá-los olhando pra trás. Então você tem que confiar que os pontos se ligarão algum dia no futuro. Você tem que confiar em algo – seu instinto, destino, vida, carma, o que for. Esta abordagem nunca me desapontou, e fez toda diferença na minha vida”*

*Steve Jobs*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Particularidades da dinâmica folicular da espécie <i>Bos taurus indicus</i> .....	3
2.2. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em novilhas púberes Nelore.....	5
2.3. Sincronizações da emergência da onda folicular.....	6
2.4. Emprego de dispositivos intravaginais de progesterona.....	7
2.5. Efeito da concentração de progesterona no desenvolvimento folicular e fertilidade.....	8
2.6. Efeito da maturidade folicular na taxa de concepção em protocolos de IATF...	12
2.7. Influência da duração do proestro na fertilidade.....	13
2.8. Efeito da progesterona pós-IA.....	16
3. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	18
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	28
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>ABSTRACT</b> .....	31
1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
2. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
2.1. Experimento 1 .....	34
2.1.1. Local experimental, animais e tratamentos.....	34
2.1.2. Exames Ultra-sonográficos.....	36
2.1.3. Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona .....	36

2.1.4.	Dosagem da progesterona sérica.....	36
2.1.5.	Análise Estatística .....	36
2.2.	Experimento 2.....	38
2.2.1.	Local experimental, animais e tratamentos.....	38
2.2.2.	Exames Ultra-sonográficos.....	40
2.2.3.	Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona .....	40
2.2.4.	Dosagem da progesterona sérica.....	40
2.2.5.	Análise Estatística. ....	41
2.3.	Experimento 3.....	43
2.3.1.	Local experimental, animais e tratamentos.....	43
2.3.2.	Exames Ultra-sonográficos.....	44
2.3.3.	Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona .....	45
2.3.4.	Dosagem da progesterona sérica.....	45
2.3.5.	Análise Estatística. ....	45
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	47
3.1.	Experimento 1.....	47
3.2.	Experimento 2.....	56
3.3.	Experimento 3:.....	67
4.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	79
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	80
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	87
	<b>CONCLUSÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES</b> .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BE – Benzoato de estradiol  
CIDR – Dispositivo intravaginal de progesterona  
CL – Corpo Lúteo  
ECC – Escore de Condição Corporal  
eCG – Gonadotrofina Coriônica Eqüina  
ECP – Cipionato de Estradiol  
E<sub>2</sub> – Estradiol  
FD – Folículo Dominante  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
IA – Inseminação Artificial  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
LH – Hormônio Luteinizante  
P<sub>4</sub> – Progesterona  
PGF<sub>2</sub>α – Prostaglandina F2alfa

**LISTA DE TABELAS****Página****CAPITULO 2**

TABELA 1.....	48
Valores descritivos (média dos quadrados mínimos e erro padrão da média) da concentração sérica de progesterona e diâmetro folicular nos dias 7 e 9 de 408 novilhas cíclicas.	
TABELA 2.....	52
Taxa de concepção, taxa de prenhez, momento cio e diâmetro folicular de 487 novilhas cíclicas detectadas em cio. Todos os valores reportados são referente à média dos quadrados mínimos e erro padrão da média.	
TABELA 3.....	53
Taxa de concepção de acordo com o momento do cio ( $\leq 3,0$ ou $> 3,0$ dias) de 487 novilhas.	
TABELA 4.....	64
Taxa de ovulação, concepção e prenhez de 1.083 novilhas Nelore cíclicas que receberam dispositivo intravaginal de progesterona novo ou previamente utilizado por 18 dias, inseminadas 48h, 54h e 72h após a remoção do dispositivo (Fatorial 2x3).	
TABELA 5.....	70
Taxa de ovulação, concepção e prenhez de 474 novilhas Nelore cíclicas que receberam os tratamentos: 1 mL de BE (Grupo1), 200 UI de eCG (Grupo 2) ou CIDR10 (Grupo 3).	

## LISTA DE FIGURAS

Página

## CAPITULO 2

FIGURA 1.....35

Diagrama esquemático do experimento 1: **D -20 a -7**: US1 - avaliação da presença de CL; **D0**: aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do CIDR novo (1º uso) ou previamente utilizado por 18 dias (3º uso); **D7**: aplicação de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$  em todos animais e retirada de metade dos dispositivos de 1º e 3º uso seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador; Sg1 + US2: coleta de sangue e avaliação do diâmetro do maior folículo de um subgrupo de animais; **D8**: início da observação de cio; **D9**: Sg2 e US3: coleta de sangue e avaliação do diâmetro do maior folículo do mesmo subgrupo do dia 7, retirada do restante dos dispositivos seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador **Cio**: observação de cio por 7 dias e IA após 12 h do início do cio; US4: avaliação do diâmetro do maior folículo no momento da IA; **D16**: término da observação de cio; **D18**: Coleta de sangue de uma amostragem de animais; **D56**: US5 - diagnóstico de gestação após o término da observação de cio.

FIGURA 2.....39

Diagrama esquemático do experimento 2: **D-30 a -20**: US1 - avaliação da presença de CL; **D0**: aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do dispositivo intravaginal de progesterona novo (1º uso) ou previamente utilizado por 18 dias (3º uso); **D7**: aplicação de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$ , Sg1 + US2: coleta de sangue e avaliação do diâmetro folicular (n=255); **D9**: aplicação de ECP nos grupo CIDR1-48h e CIDR3-48h; retirada do CIDR seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador e observação de cio até o momento da IATF, Sg2 + US3: coleta de sangue e avaliação do diâmetro folicular (n=532); **D11 e D12**: IATF + US4 – avaliação do diâmetro do maior folículo;

**D19:** Sg3: coleta de sangue 7 dias depois da IATF; **D51:** US5 - diagnóstico de gestação por ultra-sonografia 40 dias após a IATF.

FIGURA 3.....	44
Diagrama esquemático do experimento 3: <b>D-30 a -20:</b> US1 - avaliação da presença de CL; <b>D-1:</b> aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do dispositivo intravaginal de progesterona novo (CIDR1) no G3; <b>D0:</b> aplicação de 1 mg de BE no G1 e 2mg no G2, inserção do CIDR1; <b>D7:</b> aplicação de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$ ; <b>D9:</b> aplicação de 0,5 mg de ECP; administração de 200 UI de eCG no G2, retirada do CIDR; <b>D11:</b> IATF e US2: avaliação do diâmetro do maior folículo de um subgrupo de animais (n = 251), <b>D18:</b> Sg1: coleta de sangue 7 dias depois da IATF; <b>D51:</b> US3 - diagnóstico de gestação por ultra-sonografia 40 dias após a IATF.	
FIGURA 4.....	47
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> e diâmetro do maior folículo no dia 7 (n= 408).	
FIGURA 5.....	48
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 408).	
FIGURA 6.....	49
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 225).	
FIGURA 7.....	49
Correlação entre o diâmetro do maior folículo no dia 7 e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 408).	

FIGURA 8.....	50
Efeito da concentração sérica de P <sub>4</sub> no dia 7 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 7 dias (n = 133).	
FIGURA 9.....	50
Efeito da concentração sérica de P <sub>4</sub> no dia 9 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 9 dias (n = 171).	
FIGURA 10.....	51
Efeito do diâmetro do maior folículo do dia 7 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 7 dias (n = 133).	
FIGURA 11.....	51
Efeito do diâmetro do maior folículo do dia 9 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 9 dias (n = 171).	
FIGURA 12.....	53
Efeito do momento do estro na probabilidade de concepção em 487 novilhas cíclicas que receberam CIDR por 7 dias (n= 224) ou 9 dias (n= 263).	
FIGURA 13.....	54
Variação da distribuição do cio entre as novilhas que permaneceram com CIDR por 7 (n= 224) ou 9 dias (n= 263).	
FIGURA 14.....	54
Gráfico de distribuição de cio dos grupos CIDR1-d7 (n= 112) e CIDR1-d9 (n= 125).	
FIGURA 15.....	55
Gráfico de distribuição de cio dos grupos CIDR3-d7 (n= 112) e CIDR3-d9 (n= 138).	

FIGURA 16.....	56
Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IA e a concentração de progesterona 7 dias após a IA em novilhas Nelore cíclicas submetidas a detecção de cio (n = 99).	
FIGURA 17.....	57
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 7 (n = 250).	
FIGURA 18.....	58
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> do dia 7 e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 250).	
FIGURA 19.....	58
Correlação entre a concentração sérica de P <sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 532).	
FIGURA 20.....	59
Correlação entre o diâmetro do maior folículo no dia 7 e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 250).	
FIGURA 21.....	60
Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) na probabilidade de ovulação (P <sub>4</sub> ≥ 1,0 ng/ml dez dias após a remoção do dispositivo ) de 957 novilhas Nelore cíclicas .	
FIGURA 22.....	61
Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IATF e a concentração sérica de P <sub>4</sub> dez dias após a remoção do CIDR em 797 novilhas Nelore ovuladas.	

FIGURA 23.....	62
Efeito da concentração sérica de progesterona do momento da retirada do dispositivo (dia 9) na probabilidade de concepção de 449 novilhas Nelore cíclicas.	
FIGURA 24.....	62
Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na probabilidade de concepção de 800 novilhas Nelore ovuladas (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente).	
FIGURA 25.....	63
Distribuição das novilhas de acordo com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF (mm).	
FIGURA 26.....	63
Efeito da concentração sérica de progesterona dez dias após a remoção do dispositivo na probabilidade de concepção de 926 novilhas Nelore ovuladas.	
FIGURA 27.....	65
Distribuição do estro das novilhas de acordo com o tratamento (CIDR1-48h; n= 150, CIDR1-54h; n= 151, CIDR1-72h; n= 153, CIDR3-48h; n= 157; CIDR3-54h; n= 153, CIDR3-72h; n=156).	
FIGURA 28.....	66
Efeito do diâmetro do maior no momento da retirada do dispositivo (dia 9) na probabilidade de manifestar cio de acordo com momento da inseminação (IATF -48h, n= 152; IATF – 54h, n= 148; IATF – 72h; n=148)	
FIGURA 29.....	67
Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) na probabilidade de ovulação ( $P_4 \geq 1,0$ ng/ml nove dias após a remoção do dispositivo) de 230 novilhas Nelore cíclicas.	

FIGURA 30.....	68
Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IATF e a concentração sérica de progesterona nove dias após a remoção do CIDR em 197 novilhas Nelore ovuladas.	
FIGURA 31.....	69
Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na probabilidade de concepção de 197 novilhas Nelore ovuladas (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) sincronizadas com CIDR de 1º uso (Grupo 1: 1mg de BE, Grupo 2: 200 UI de eCG e Grupo 3: CIDR por 10 dias).	
FIGURA 32.....	69
Efeito da concentração sérica de progesterona nove dias após a remoção do dispositivo na probabilidade de concepção de 412 novilhas Nelore ovuladas.	

# CAPÍTULO 1

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 180.040.323 de cabeças bovinas, estima-se que desse rebanho, 78% dos animais sejam classificados como aptidão para corte, dos quais 10% são novilhas de 2 a 3 anos e 43% são vacas (ANUALPEC, 2011).

A agropecuária representou 22,34% na participação do Produto Interno Bruto brasileiro no ano de 2010 (CEPEA-USP/CNA, 2010). Segundo o mesmo instituto, o setor de agronegócio brasileiro acumulou expansão de 3% no primeiro semestre de 2011. No mesmo período de 2010, a taxa se limitava a 1,8%. As altas cotações de importantes produtos agropecuários, dentre eles a carne bovina em paralelo com o aumento da produção, impulsionaram o crescimento. A agricultura se destacou no período, acumulando alta de 6,75%. Embora, de forma menos expressiva, o segmento da pecuária, também, cresceu 2,43%.

As altas dos insumos associado ao desenvolvimento da economia exigem dos pecuaristas máxima eficiência para garantia de satisfatório retorno econômico. Desta forma, elevados índices de produção, associados à alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade. Neste contexto, a inseminação artificial (IA) é a tecnologia mais viável de que os produtores de gado dispõem para o melhoramento genético do rebanho. A IA provou ser uma técnica viável, para acelerar o ganho genético e o retorno econômico da pecuária. O relatório da ASBIA 2010 demonstrou aumento de 39,35% no volume de doses comercializadas nos últimos 10 anos (2001 a 2010).

É possível sugerir que grande parte desse crescimento foi alavancado pelo emprego de programas de IA em tempo fixo (IATF), que eliminam falhas na detecção de estro devido as particularidades das fêmeas *Bos indicus* (PINHEIRO et al., 1998, BÓ et al., 2003 e SARTORI & BARROS, 2010) e permitem a inseminação de vacas em anestro (MENEGETTI et al., 2009), aumentando os índices reprodutivos. Embora taxas de prenhez satisfatórias sejam obtidas com a utilização da IATF em vacas de corte (MENEGETTI et al., 2009), os resultados em novilhas Nelore púberes, geralmente, são menores do que os observados na IA após a observação do estro (DIAS et al., 2009).

Possíveis razões para a menor fertilidade em programas de IATF nesses animais podem estar relacionadas às baixas taxas de sincronização (CARVALHO et al., 2008) e/ou baixa taxa de concepção (DIAS et al., 2009 e PERES et al., 2009). Um dos fatores que afetam a fertilidade é a maturidade dos folículos induzidos a ovular,

tanto em relação à competência oocitária quanto em relação ao ambiente uterino gerado durante o proestro (MUSSARD et al., 2007 e BRIDGES et al., 2010). As causas dessa menor maturidade folicular podem estar relacionadas à interferência das altas concentrações de progesterona ( $P_4$ ) durante o protocolo de sincronização, que reduzem o diâmetro folicular a IATF (CARVALHO et al., 2008) e proporcionam um ambiente uterino inadequado para o desenvolvimento do conceito (PERRY et al., 2005 e 2007).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a interferência das concentrações de  $P_4$  durante o desenvolvimento folicular e a influência do diâmetro folicular e duração do proestro na fertilidade de novilhas Nelore púbere inseminada após detecção do cio ou em tempo fixo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Particularidades da dinâmica folicular da espécie *Bos taurus indicus*

Avanços nos protocolos de sincronização da ovulação exigem melhor compreensão dos padrões de desenvolvimento folicular e dos mecanismos hormonais que regulam a dinâmica folicular dos bovinos, principalmente em fêmeas da raça zebuína, devido ao maior número de animais no Brasil.

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em um padrão de ondas. Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 1996). Destes, apenas o folículo dominante continua seu desenvolvimento, enquanto os outros regridem (folículos subordinados). Apesar das fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* apresentarem grande similaridade na dinâmica folicular, algumas peculiaridades importantes são observadas entre as duas raças.

Figueiredo et al. (1997) observaram predominância de três ondas em novilhas Nelore (64,7%, n=16), enquanto que, em novilhas Holandesas, tem sido descrito maior ocorrência de duas ondas foliculares (55,5%) e, raramente, quatro ondas (SARTORI et al., 2004).

Durante a divergência, Sartori et al. (2004) verificaram que o diâmetro do folículo dominante em novilhas Holandesa foi  $8,3 \pm 0,2$  mm. Embora, nesse momento, o diâmetro seja inferior em novilhas *Bos indicus* (5,4 a 6,2 mm, SARTORELLI et al.,

2005; CASTILHO et al., 2006 e GIMENES et al., 2008), o intervalo entre a ovulação e a divergência foi similar entre as duas raças (aproximadamente 2,7 dias, SARTORELLI et al., 2005, CASTILHO et al., 2006 e GIMENES et al., 2008).

Após a divergência, o folículo torna-se dependente de LH (GINTHER et al., 1996) e conforme o desenvolvimento folicular ocorre, este passa a ser responsivo a estímulos ovulatórios. De acordo com Gimenes et al. (2008), o tratamento de novilhas Nelore com 25 mg de pLH resultou em ovulação de 33,3 % de folículos entre 7,0 e 8,4 mm e a proporção de animais ovulados aumentou significativamente quando o folículo alcançou 8,5 mm (8,5 a 10 mm – 80% e > 10 mm – 90%). Somente, folículos de 10 mm adquiram capacidade ovulatória e foram capazes de ovular em resposta à altas doses de LH (40 mg) em vacas Holandesas, sendo que taxas de ovulação superiores a 50% foram obtidas com menor dose de LH (4 mg) em animais com folículos maiores de 12 mm (SARTORI et al. 2001). Essas 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.

Outra diferença fisiológica entre novilhas *Bos taurus* e *Bos indicus* está relacionada ao diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular. Em *Bos taurus* são descritos diâmetros de  $15,2 \pm 0,3$  mm para a primeira onda folicular (SARTORI et al., 2004). Já, em *Bos indicus* o diâmetro relatado foi  $11,30 \pm 0,3$  mm (FIGUEIREDO et al., 1997). A partir desses relatos pode-se verificar que o diâmetro do folículo dominante e do folículo ovulatório em zebuínos é menor do que em taurinos.

Também, o diâmetro do corpo lúteo (CL) parece ser menor em *Bos indicus* que em *Bos taurus*. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro (FIGUEIREDO et al., 1997) ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 a 25 mm (THATCHER et al., 1993 e ADAMS et al., 1993). Carvalho et al. (2008) observaram que o diâmetro do CL em novilhas *Bos indicus* ( $15,3 \pm 0,8$  mm) foi menor comparado as novilhas *Bos taurus* ( $18,4 \pm 1,0$  mm) e não diferiu das fêmeas cruzadas ( $17,7 \pm 0,6$  mm). Embora, Vasconcelos et al. (2001) tenham demonstrado que o diâmetro do CL está diretamente correlacionado com as concentrações de progesterona circulante. Bastos et al. (2010) avaliando as concentrações de  $P_4$  em vacas Nelore e Holandesas secas sob mesmas condições climáticas e nutricionais, observaram que, mesmo após a ovulação de folículos menores (15,7 vs 13,4 mm), as concentrações de  $P_4$  nos dias 7 (2,8 vs 2,0 ng/ml) e 14 (4,6 vs 4,1 ng/ml) do ciclo estral foram superiores em animais da raça Nelore. Carvalho et al. (2008) verificaram

maiores concentrações de  $P_4$  em novilhas Nelore durante o tratamento com dispositivo intravaginal de  $P_4$  e sugeriram menor metabolismo, que poderia ter contribuído para manter maiores concentrações de  $P_4$  em novilhas zebuínas.

Além das particularidades referentes à dinâmica folicular dos animais zebuínos, é importante fazer algumas considerações quanto às características do comportamento de cio e intervalo cio-ovulação, pois estes são parâmetros essenciais para a escolha do melhor momento da IA.

Fêmeas *Bos indicus* apresentam estro de duração mais curta, entre 10 a 12,9 h (PINHEIRO et al., 1998 e BÓ et al., 2003) quando comparado as taurinas 16,3 h (BÓ et al., 2003). Somado a este fator, foi observado 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). Em revisão recente, Sartori & Barros. (2011) verificaram baixa taxa de detecção de cio em novilhas Nelore (< 50%; n=24), apesar da alta taxa de ovulação (76,7%) após tratamento com PGF2 $\alpha$ . Os autores concluíram que a falha na detecção de estro ocorreu devido a não expressão do estro nos animais submetidos à detecção de cio durante 24h por 7 dias. Esses fatores em conjunto dificultam o manejo e a eficácia de detecção de cio, principalmente, na espécie *Bos indicus*.

Pinheiro et al. (1998) verificaram que o intervalo entre o início do cio e a ovulação foi mais curto em novilhas Nelore (26,6 $\pm$ 0,44h) em relação a estudos anteriores com taurinos (28 a 32 h, revisado por (BÓ et al., 2003). Entretanto, no estudo de Mizuta. (2003), o intervalo cio-ovulação entre as duas raças não diferiu (Nelore: 27,1 $\pm$ 3,3h vs Angus, 26,1 $\pm$ 6,3h), apesar da diferença na duração do cio entre os dois grupos (Nelore: 12,9 $\pm$ 2,9 h vs. 16,3 $\pm$ 2,9 horas em Angus).

Estas diferenças tornam a observação de estro um ponto ainda mais crítico a ser considerado na IA, aumentando a necessidade de tratamentos de sincronização que resultem em bons resultados.

## **2.2. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em novilhas púberes Nelore**

Os programas de sincronização da ovulação utilizados no Brasil apresentam resultados satisfatórios e possibilitam o emprego da IATF em vacas zebuínas (MENEHETTI et al., 2009 e SÁ FILHO et al., 2009). Contudo, os protocolos hormonais desenvolvidos para vacas lactantes não apresentam resultados satisfatórios quando utilizado em novilhas púberes (SÁ FILHO et al., 2009).

### **2.3. Sincronizações da emergência da onda folicular**

A sincronização de uma nova onda folicular é o primeiro passo, para a realização do protocolo de IATF. Diferentes estratégias podem ser empregadas no início do protocolo para indução de uma nova onda (BÓ et al., 1995), entretanto a mais viável é feita através da administração de hormônios que induzem a ovulação (ex: GnRH) ou atresia do folículo dominante (ex: estradiol + progesterona).

O GnRH age, diretamente, na hipófise, induzindo a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Em torno de 24 a 32 horas após a sua administração, ocorre a ovulação do folículo dominante (PURSLEY et al., 1995).

Em protocolos que utilizam GnRH (ex: protocolo Ovsynch), uma alta taxa de ovulação é crítica para obtenção de resultados satisfatórios, como foi demonstrado previamente em vacas de leite (VASCONCELOS et al., 1999). Segundo esses autores, a resposta ao primeiro GnRH variou de acordo com o momento do ciclo estral, e maiores taxas (96%) foram observadas entre os dias 5 e 9 do ciclo, devido à presença de um folículo dominante responsivo ao LH. Martinez et al. (2000) observaram que a emergência da nova onda folicular após o tratamento com GnRH + CIDR (-1 a 4 dias) em novilhas, foi mais variável que o tratamento com 17  $\beta$  estradiol + P<sub>4</sub> (3 a 4 dias), devido ao estágio do desenvolvimento do folículo dominante no momento da administração do GnRH.

Pursley et al. (1995) verificaram que a resposta ao GnRH tem valor limitado na sincronização da emergência folicular em novilhas, pois somente 50% das novilhas responderam ao GnRH no início do protocolo (Ovsynch). Por isso, Lamb et al. (1996) não observaram diferença na distribuição de cio ( $48,9 \pm 0,8$ h) após a sincronização do estro de novilhas taurinas (78 – 100% cíclicas), empregando ou não GnRH no início do protocolo (CIDR 7 dias + 25 mg PGF<sub>2</sub> $\alpha$  + detecção de cio por 72 horas).

O recrutamento da nova onda folicular, também, pode ser realizado através do uso de E<sub>2</sub> associado à P<sub>4</sub> (CARVALHO et al., 2008). Apenas o uso de P<sub>4</sub> provocou um efeito inibitório transitório nos níveis de LH (36h) e não alterou as concentrações de FSH em vacas ovariectomizadas (BURKE et al., 1996). Porém, a adição de BE ao início do tratamento com CIDR potencializou o efeito de feedback negativo sobre os níveis de LH (5 dias), provavelmente, através do aumento da sensibilidade do hipotálamo a P<sub>4</sub> e deprimiu a secreção de FSH (BURKE et al., 1996). Os autores ainda

observaram que após a remoção do dispositivo, os níveis de LH se elevaram rapidamente, e atribuíram este fator a possível sensibilização do eixo gonadotrófico ao E<sub>2</sub> exógeno.

Desse modo, a administração conjunta de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub> permite o início sincronizado de uma nova onda através da indução da atresia, independente da idade ou diâmetro folicular (BURKE et al., 1999 e 2003). Contudo, o tempo entre a administração e o início da nova onda é variável de acordo com fonte e a dose de estrógeno (BURKE et al., 2003).

Burke et al. (2003) demonstraram que o momento do aumento das concentrações de FSH que precedem o início da nova onda folicular variou de acordo com a dose de BE empregada. Tal variação foi atribuída ao tempo necessário para o E<sub>2</sub> alcançar níveis não inibitórios ao pico de FSH.

Carvalho et al. (2008) verificaram boa resposta após o tratamento de novilhas *Bos indicus* com 2 mg de E<sub>2</sub> e dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub>. Segundo os autores, a emergência ocorreu 3,1 dias após o início do tratamento. Meneghetti et al. (2009) observaram que a administração de 2 mg de BE no início do protocolo de sincronização, proporcionou taxas de ovulação (~90%) e prenhez (~50%) satisfatórias, quando associado a um dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> para o recrutamento de uma nova onda folicular em vacas da raça zebuína.

Tendo em vista os resultados, pode-se concluir que o emprego de E<sub>2</sub> associado à P<sub>4</sub> no início do protocolo constitui uma alternativa eficiente para sincronização da emergência de uma nova onda folicular.

#### **2.4. Emprego de dispositivos intravaginais de progesterona**

Os protocolos utilizados na sincronização da ovulação permitem o controle do desenvolvimento folicular até o momento da IA sem necessidade de detecção do estro.

Programas de sincronização da ovulação utilizando apenas GnRH e PGF2 $\alpha$  conhecido como "Ovsynch" (PURSLEY et al., 1995) e variações desse protocolo (ex: "Co-Synch"; GEARY et al., 2001), possibilitam realizar a IATF com taxas de prenhez satisfatórias (Ovsynch: 52% vs Co-Synch: 54%) em vacas de corte taurinas.

Contudo, baixas taxas de fertilidade têm sido reportadas quando esses protocolos são empregados em novilhas, devido à alta porcentagem de animais que demonstram estro (17,3%) antes da aplicação da PGF2 $\alpha$  (Roy et. al, 1999), como

conseqüência da baixa resposta ao primeiro GnRH (PURSLEY et al., 1995; LAMB et al., 1996 e MARTINEZ et al., 2000).

Vasconcelos et al. (1999), avaliando o protocolo “Ovsynch”, observaram que nenhuma vaca sincronizada durante a fase inicial do ciclo estral (1-12) ovulou antecipadamente, relacionando este fato aos níveis contínuos de  $P_4$  até o tratamento com  $PGF2\alpha$ . Entretanto, todas as vacas que não responderam ao primeiro GnRH e que ovularam precocemente estavam na fase final do ciclo estral (13-22). Neste caso, a luteólise ocorreu antes da aplicação da  $PGF2\alpha$  permitindo a ovulação do folículo dominante (VASCONCELOS et al., 1999).

Uma alternativa simples e que visa prevenir ovulações antecipadas é a utilização de um dispositivo de  $P_4$  durante o protocolo (MARTINEZ et al., 2002a). Segundo os autores, a adição ou não de CIDR até o momento da aplicação da  $PGF2\alpha$  incrementou a taxa de prenhez de novilhas (38,5% vs 68,0%).

Martinez et al. (2002b) verificaram taxas de prenhez aceitáveis em novilhas taurinas quando compararam os protocolos Co-Synch + CIDR (65%) vs BE/ $P_4$  + CIDR/ $PGF2\alpha$  no dia 7, seguido de BE no dia 8 e IATF 28 h depois (61,5%). Apesar de não ter observado diferença significativa entre os dois protocolos, os autores especulam que taxas de prenhez menos variáveis devem ser obtidas com o uso de BE, uma vez que a resposta ao primeiro GnRH limita o uso de protocolos a base de GnRH em novilhas.

A necessidade do controle da fase luteal limita a utilização de protocolos de sincronização sem o uso de  $P_4$ . Portanto, o emprego de dispositivos intravaginais de  $P_4$ , associados ao emprego de  $E_2$ , permite o controle com maior precisão do desenvolvimento do folículo dominante até o momento da IATF, resultando em taxas de prenhez satisfatórias em fêmeas *Bos indicus* (MENEGETTI et al., 2009).

## **2.5. Efeito da concentração de progesterona no desenvolvimento folicular e fertilidade.**

Após a divergência folicular, o folículo dominante passa a ser dependente de LH (GINTHER et al., 1996). Taft et al. (1996) demonstraram que a freqüência dos pulsos de LH foi importante na manutenção do folículo dominante, e a extensão com que a progesterona inibia a secreção de LH determinava a duração do folículo dominante.

Adams et al. (1992) e Savio et al. (1993) observaram que o tempo de dominância do folículo dominante pode ser estendido, ou reduzido pelo aumento ou decréscimo na concentração de progesterona. Segundo os autores, concentrações subluteais de  $P_4$  (1 a 2 ng/ml) tem sido associada ao maior crescimento folicular.

De acordo com dados da literatura, existe uma relação inversa entre a concentração de  $P_4$  e a pulsatilidade de LH. Bergfeld et al. (1996) observaram que a frequência de pulsos de LH (4,1 pulsos/6h) e os níveis de  $17\beta$  estradiol (12,7 pg/ml) foram maiores em vacas tratadas com baixas concentrações de  $P_4$  (1,3 ng/ml) comparados aos animais tratados com altas concentrações de  $P_4$  (4,6 ng/ml), cujos os pulsos de LH e níveis de  $17\beta$   $E_2$  foram respectivamente 1,3 pulsos/6h e 3,5 pg/ml. Posteriormente, Kojima et al. (2003) verificaram que a frequência pulsátil de LH e a secreção de  $E_2$  também foram maiores, em vacas que receberam baixas concentrações de  $P_4$  (baixa: 1-3 ng/ml vs alta: 5-9 ng/ml).

A concentração de  $P_4$  sérica de 1-2 ng/ml (na ausência de um CL) é suficiente para manipular a duração do folículo dominante (KOJIMA et al., 2003) até a indução da ovulação. O sucesso desses protocolos, que utilizam dispositivos de progesterona, depende da obtenção de um folículo dominante de boa qualidade independente do status metabólico ou estágio do desenvolvimento folicular no início do protocolo (AUSTIN et al., 1999).

O estro e a fertilidade em bovinos tratados com progesterona visando à sincronização do estro e ovulação são influenciadas pela duração do tratamento com progesterona (MIHM et al., 1994). A indução da persistência do folículo dominante (> 9 dias), por meio do uso de progestágeno, resultou em queda significativa na taxa de prenhez em novilhas de corte (MIHM et al., 1994 e AUSTIN et al., 1999) e vacas de leite não lactantes (SAVIO et al., 1993).

Revah e Butler (1996) verificaram que oócitos provenientes de folículos de vacas de leite com maior período de dominância, iniciavam a ativação prematura da meiose, provavelmente devido ao maior período de exposição ao LH. Os autores sugeriram ser, esta, a causa de menor fertilidade após a sincronização de cio com progestágenos por mais de sete dias. Por outro lado, Ahmad et al. (1995) e Shaham-Albalancy et al. (1996), sugeriram que altas concentrações de estradiol, devido à presença de folículos persistentes, poderiam influenciar as condições das tubas uterinas e/ou do útero, podendo ser a causa da menor fertilidade, quando da presença de folículos persistentes. Mantovani et al. (2005) observaram que a sincronização de receptoras cruzadas com dispositivo de  $P_4$  por 14 dias reduziu a taxa de concepção

atribuindo esse resultado à presença de folículos persistentes. Embora o aumento do tempo de dominância esteja associado à redução da taxa de prenhez em vacas de leite (BLEACH et al., 2004, CERRI et al., 2009 e SANTOS et al. 2010), resultados similares não foram observados em animais de corte. De acordo com Ahmad et al. (1997), Bridges et al. (2008) e Dias et al. (2011), o tempo de dominância não interferiu na taxa de concepção desses animais.

Os níveis de progesterona durante o desenvolvimento folicular também desempenham um papel importante na fertilidade. Vasconcelos et al. (1999) e Bisinotto et al. (2010) observaram queda na taxa de prenhez quando vacas de leite foram submetidas a protocolo de sincronização sob baixos níveis de  $P_4$ . Os autores sugeriram que o aumento dos pulsos de LH pode ter prejudicado a qualidade do oócito. Contudo, Cerri et al. (2011a) verificaram que a qualidade de embriões coletados 6 dias após a IA, provenientes de folículos que cresceram sob baixas concentrações de progesterona, foi apenas discretamente inferior em relação aos obtidos de folículos que se desenvolveram sob altos níveis de progesterona sendo que a taxa de fertilização foi similar entre os grupos. Segundo Cerri et al. (2011b), a queda de fertilidade nesses animais pode estar relacionada à luteólise prematura, devido à indução precoce da expressão de receptores  $\alpha$ -estrógeno com liberação precoce de  $PGF2\alpha$  pelo útero. Embora esses autores tenham verificado efeito negativo das baixas concentrações de  $P_4$ , sobre a taxa de prenhez de vacas Holandesas lactantes. Stevenson et al. (2008) observaram que a aplicação de  $PGF2\alpha$  no início do protocolo Cosynch+CIDR em novilhas Holandesas, resultou em maior desenvolvimento folicular, e aumento da expressão do estro entre a retirada do dispositivo e IATF, sem comprometer a taxa de prenhez, quando comparado aos animais que não receberam  $PGF2\alpha$  no início do protocolo.

Os trabalhos de Carvalho et al. (2008) e Dias et al. (2009) demonstraram efeito prejudicial da alta concentração de  $P_4$  pré-IA no desempenho de novilhas zebuínas quando submetidos à IATF. Carvalho et al. (2008) sugerem que pode haver um menor metabolismo de  $P_4$  em novilhas *Bos indicus*, e esse menor metabolismo contribuiria para manter maiores concentrações de  $P_4$  em novilhas zebuínas, prejudicando o desenvolvimento folicular, e subseqüentemente, a taxa de ovulação. De acordo com Dias et al. (2009), o emprego de estratégias que reduzem a concentração circulante de  $P_4$  durante os estágios finais do protocolo de sincronização, e/ou aumentam o estímulo gonadotrópico, incrementam o desempenho reprodutivo em novilhas púberes. Dias et al. (2009) constataram efeito do número de usos do CIDR (novo, ou

previamente utilizado por 9 ou 18 dias) na taxa de prenhez (20,5%, 22,7% e 35,5%) e concepção (37,2%, 37,8% e 53,2%) em protocolo de sincronização de 9 dias.

Em concordância com esses dados, Peres et al. (2009) verificaram que a antecipação da aplicação de PGF2 $\alpha$  (dia 7) em protocolo de sincronização com CIDR por 9 dias incrementou a taxa de prenhez (dia 7: 52% vs dia 9: 36,4%) de vacas não lactantes. Adicionalmente, Baruselli et al. (2004), Peres et al. (2009), Dias et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010a) observaram efeito positivo da administração de eCG no dia da retirada do dispositivo de P<sub>4</sub> na fertilidade de novilhas púberes. Os autores atribuíram esse fato a suplementação gonadotrófica exógena (LH e FSH), que favorece o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório e minimiza os efeitos negativos das altas concentrações de progesterona. De acordo com Peres et al. (2009), o emprego do eCG foi especialmente importante quando as concentrações de P<sub>4</sub>, no momento da retirada do dispositivo, foram superiores a 3,0 ng/ml, demonstrando assim que o eCG permite atenuar os efeitos deletérios das altas concentrações de P<sub>4</sub> durante o desenvolvimento folicular.

Em outro estudo, Colazo et al. (2008) também observaram maior taxa de ovulação em novilhas com baixa concentração de P<sub>4</sub> e associaram o resultado ao maior desenvolvimento folicular, e capacidade ovulatória ao estímulo de GnRH. Mantovani et al. (2010) verificaram efeito positivo da redução das concentrações de P<sub>4</sub> no desenvolvimento folicular de novilhas púberes cruzadas tratadas com CIDR por 8 dias.

Alguns estudos sugerem que receptores de GnRH na hipófise podem ser regulados pelo próprio GnRH (NETT et al., 2002), e que altas concentrações de P<sub>4</sub> causam diminuição nos pulsos de GnRH, minimizando a formação de receptores de GnRH na hipófise, podendo diminuir a taxa de ovulação (TURZILLO et al., 1995). O estradiol também exerce um papel importante no eixo hipotálamo-hipófise, já que esse hormônio promove um aumento dos receptores de GnRH. Além de modular a expressão de genes que codificam subunidades de FSH e LH, alterando o padrão de liberação dessas gonadotrofinas (NETT et al., 2002).

Esses dados em conjunto demonstram que ao contrário do que ocorre em vacas leiteiras, às altas concentrações de P<sub>4</sub> durante o protocolo de sincronização são indesejáveis em novilhas zebuínas púberes, pois as concentrações de P<sub>4</sub> estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento folicular que interferem na eficiência reprodutiva desses animais.

## **2.6. Efeito da maturidade folicular na taxa de concepção em protocolos de IATF**

A fertilidade após a indução da ovulação de folículos persistentes é reduzida (MIHM et al., 1994 e AUSTIN et al., 1999) e a maioria dos programas de sincronização da ovulação é estruturado para minimizar o desenvolvimento e a ovulação de folículos dominantes persistentes. Contudo, a ovulação de folículos imaturos também compromete a taxa de prenhez em protocolos de IATF (PERRY et al., 2007).

Vasconcelos et al. (2001) observaram que a redução do diâmetro do folículo ovulatório, prejudicou a fertilidade ( $3/21 = 14,3\%$  vs  $10/21 = 47,6\%$ ) de vacas leiteiras sincronizadas com protocolo Ovsynch. Os autores associaram este resultado à redução dos níveis de  $E_2$  pré-ovulatório, tamanho de CL e concentração circulante de  $P_4$  pós IATF. Em estudo com animais de corte, Mussard et al. (2003a) também verificaram que animais com folículos pequenos e imaturos (10 mm) apresentaram diminuição na taxa de concepção ( $2/45 = 4,4\%$  vs.  $31/54 = 57,4\%$ ) e menor concentração de  $P_4$  ( $4,9 \pm 0,2$  vs.  $5,5 \pm 0,2$  ng/ml), em relação às novilhas com folículos maiores (13 mm). Mussard et al. (2007), verificaram resultados similares ao induzir a ovulação de folículos de menor idade comparados a animais que ovularam espontaneamente. De acordo com os autores, as causas desta menor fertilidade podem estar relacionadas às reduzidas concentrações de  $P_4$  pós IA, incompetência do oócito e/ou comprometimento do ambiente uterino, após a indução da ovulação de folículos imaturos.

Sartori et al. (2006) verificaram que vacas de leite com menor diâmetro do folículo ovulatório (10 – 15 mm) que receberam transferência de embrião (TE), apresentaram maior taxa de concepção ( $42,3\% = 11/26$ ) em relação aos animais submetidos a IATF ( $23,7\% = 9/38$ ). Segundo os autores, esses resultados indicam possível comprometimento oocitário, após a indução da ovulação de folículos pequenos (imaturos).

Perry et al. (2005), utilizando protocolo Co-Synch em vacas pós-parto, observaram efeito quadrático do diâmetro do FD na concepção, sendo que a variação de diâmetro considerada ótima foi de 11,5 a 16mm. A indução da ovulação de folículos imaturos ( $\leq 11$  mm) resultou em queda na taxa de prenhez e aumento da mortalidade embrionária/fetal entre 27 e 68 dias após a inseminação ( $\leq 11\text{mm} = 39\%$  vs  $> 11$  mm = 0%). Os autores associaram o decréscimo na fertilidade às reduzidas concentrações

de  $E_2$  no momento da inseminação e às menores concentrações  $P_4$  após a ovulação. Em estudo posterior, Perry et al. (2007) verificaram que novilhas que ovularam espontaneamente ou após estímulo com GnRH folículos com diâmetro entre 10,8 e 15,6 mm apresentaram melhor taxa de prenhez, independentemente do comportamento do estro ou concentração de  $E_2$  circulante. Segundo os autores, o diâmetro do folículo ovulatório parece ser um bom indicador de maturidade folicular e fertilidade. Peres et al. (2009), Dias et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010a,b) observaram efeito positivo do aumento diâmetro folículo dominante no momento da IATF na taxa de prenhez de fêmeas *Bos indicus*. Embora o diâmetro folicular pareça ser um bom preditor de maturidade folicular, deve-se considerar que, Vasconcelos et al. (1999) e Bisinotto et al. (2010) verificaram que em vacas de leite o desenvolvimento folicular sob baixas concentrações de  $P_4$  resultou em maior diâmetro do folículo ovulatório, porém menor taxa de prenhez. Os autores concluíram que o ambiente hormonal em que o folículo esteve exposto durante o protocolo de sincronização foi importante para a fertilidade. De maneira similar, Bridges et al. (2010), demonstraram que a duração do proestro durante o desenvolvimento folicular, foi mais importante do que o diâmetro folicular para a fertilidade em vacas de corte.

Apesar das limitações entre a associação do diâmetro do folículo ovulatório e fertilidade, este parece ser um parâmetro simples que permite estimar com certa confiança a probabilidade de concepção. De acordo com os dados, existe um intervalo ideal, no qual diâmetros inferiores ou superiores estarão correlacionados com baixa taxa de concepção em programas de IATF. Segundo os autores, folículos maiores estão correlacionados com bons resultados em animais de corte, portanto protocolos que maximizam o diâmetro folicular até certo limite, potencialmente melhoram a taxa de prenhez.

## **2.7. Influência da duração do proestro na fertilidade**

A maturidade folicular é um parâmetro essencial que deve ser considerado no emprego de programas de IATF (PERRY et al. 2007). Contudo, a idade do folículo, intervalo entre a aplicação da  $PGF2\alpha$  e a indução da ovulação com GnRH, ou início do estro, estão estreitamente ligados a maturidade do folículo (BRIDGES et al. 2008 e 2010). Segundo dados da literatura, esse intervalo é conhecido como “duração do proestro”, e definido como o intervalo aproximado entre a regressão luteal e pico pré-ovulatório de LH.

Mussard et al. (2007) observaram que vacas *Bos taurus* de corte induzidas a ovular prematuramente apresentaram menor taxa de concepção (76% = 22/29 vs 100% = 24/24), folículos mais novos (~1,1 dia) e menor duração do proestro (1,5 dias a menos) em relação aos animais inseminados após detecção de estro. Bridges et al. (2008), verificaram que a taxa de prenhez foi cerca de 9,1% e 13,3% superior, quando o intervalo entre a administração da primeira dose de PGF2 $\alpha$  e a IATF foi estendido de 60h para 72 horas. De acordo com os autores, o aumento do proestro proporciona maior suporte gonadotrópico para o folículo ovulatório e níveis de estradiol elevados antes da ovulação.

Bridges et al. (2010) desenvolveram um modelo experimental com intuito de avaliar a taxa de concepção de vacas de corte que apresentavam diâmetro folicular constante e duração do proestro variável. Nesse modelo, todos os folículos  $\geq 5,0$  mm foram aspirados 6,75 dias após o estro sincronizado e em seguida as vacas foram distribuídas aleatoriamente para receberem PGF2 $\alpha$  4,5 (n=40) ou 5,5 dias (n=38) após a aspiração folicular (dia 0) perfazendo assim, um grupo de longa (PL= 2,25) e curta duração do proestro (PC= 1,25). No dia 6,75, os dois grupos receberam uma administração de GnRH sendo inseminados 12 horas após a aplicação. O diâmetro folicular foi similar entre os grupos (PC:  $13,0 \pm 0,2$  vs PL:  $12,6 \pm 0,2$  mm). No entanto, a maior incidência de ciclos estrais curtos foi constatada no grupo PC (74% vs 30%). Entre os animais com duração normal da fase luteal, a taxa de concepção foi menor no tratamento PC (1/7 = 14,3%) em relação ao PL (19/26 = 73%) e as concentrações séricas de P<sub>4</sub> pós IATF foram superiores no grupo PL. De acordo com os autores, estes achados enfatizam a importância de outras características além do diâmetro folicular, na fertilidade.

Peters e Pursley (2003) avaliando o protocolo Ovsynch verificaram queda na taxa de prenhez, quando o GnRH foi administrado concomitantemente com a PGF2 $\alpha$  (14,7%) ao invés de 48h após a aplicação da prostaglandina (31,3%). Segundo Peters e Pursley (2003), o encurtamento do intervalo entre a PGF2 $\alpha$  e o segundo GnRH, prejudica o desenvolvimento folicular e uterino diminuindo a fertilidade.

A base endócrina para a aparente relação entre a duração do proestro e a fertilidade foi pesquisada no segundo experimento realizado por Bridges et al. (2010). Os autores observaram que a diferença mais marcante entre os tratamentos foi que os níveis de estradiol foram prejudicados pela redução do proestro (PC:  $9,1 \pm 0,7$  vs PL:  $12,7 \pm 1,1$  pg/ml). Sugerindo que a indução prematura da ovulação (proestro curto), pode interferir na sequência normal das alterações pré-ovulatórias de estradiol e

gonadotropinas, sendo possível que esta interrupção altere o desenvolvimento uterino e prejudique o adequado suporte da gestação.

Mussard et al. (2003b) estudaram o efeito da indução da ovulação de folículos de diferentes diâmetros em receptoras de embrião. Novilhas foram induzidas a ovular folículo de 10 e 13 mm. Receptoras que ovularam folículos de 10 mm apresentaram diminuição da taxa de prenhez ( $1/12 = 8,3\%$ ) e menores concentrações de progesterona no dia 12 pós-ovulação ( $3,4 \pm 0,4$  ng/ml) comparadas às novilhas que ovularam folículos de 13 mm ( $68/12 = 66,7\%$  e  $5,6 \pm 0,3$  ng/ml). Esses dados sugerem que a incompetência do oócito, a fertilização comprometida e a mortalidade embrionária precoce (antes do dia 7 do ciclo estral) não devem constituir a única causa da redução na fertilidade de fêmeas induzidas a ovular folículos imaturos. É possível que a interrupção das alterações pré-ovulatórias de estradiol, quando folículos imaturos são induzidos a ovular, possa ser responsável pela falta de suporte ao útero para estabelecer a gestação. Perry et al. (2005 e 2007) observaram que animais detectados em estro antes da inseminação apresentaram maiores concentrações de  $E_2$  e aumento da taxa de prenhez. Os resultados de Peres et al. (2009) e Sá Filho. (2010b e 2011) também demonstraram incremento da fertilidade quando fêmeas *Bos indicus* foram detectadas em estro.

Dessa forma, Sá Filho et al. (2011) demonstraram que a administração de 1mg de ECP, após a remoção do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , foi eficiente em aumentar a porcentagem de vacas em cio e a prenhez desses animais ( $100/178 = 56,2\%$  vs  $74/190 = 39,0\%$ ) em relação ao grupo tratado com GnRH. Cerri et al. (2004) observaram efeito similar quando utilizaram o protocolo Heatsynch em vacas leiteiras (GnRH + PGF $2\alpha$  - d7 + 48h - 1mg de ECP + 48h - IATF) após pré-sincronização. Segundo Cerri et al. (2004), o emprego do ECP permitiu maior expressão de cio e dos animais detectados em estro a fertilidade foi superior em relação ao programa Selectsynch (GnRH + PGF $2\alpha$  no dia 7 + detecção de cio e IA). Em estudo subsequente com vacas de leite, Souza et al. (2007) verificaram que adição de 1mg de ECP 48 horas antes da aplicação do 2° GnRH (Ovsynch) aumentou a expressão de estro e incrementou a taxa de prenhez dos animais com folículos entre 15 e 19 mm. De acordo com autores, a suplementação com  $E_2$  exógeno possibilita aumentar as concentrações pré-ovulatórias de  $E_2$  durante o proestro, melhorando o desenvolvimento uterino e conseqüentemente a concepção.

Os esteróides reprodutivos estradiol e progesterona coordenam a função uterina. Durante o período pré-ovulatório, o estradiol prepara o útero para o

desenvolvimento inicial do concepto (revisado por DAY, 2006). O estradiol pré-ovulatório altera a morfologia do endométrio, promovendo o crescimento e desenvolvimento das células epiteliais glandulares (Murray, 1992 e Johnson et al., 1997) relacionadas com a síntese e secreção de histotrofo uterino, elemento importante no desenvolvimento inicial antes da placentação (GEISERT et al., 1988). Em ovelhas ovariectomizadas, quando as concentrações de estradiol foram inferiores às presentes no estro, não foram recuperados embriões normais e a síntese uterina de proteína foi reduzida (MILLER E MOORE, 1976a e b).

De acordo com os dados de Bridges et al. (2010) e Mussard et al. (2007), a redução da concentração circulante de estradiol pré-ovulatório está relacionado com a ocorrência de ciclo curto. Segundo Mann e Lamming (2000), o tratamento de vacas ovariectomizadas com níveis crescentes de  $17\beta$ -estradiol foi relacionado com a redução da síntese uterina de receptores de ocitocina e produção de PGFM após desafio com ocitocina. Essa redução foi mais acentuada quanto maiores foram os níveis de estradiol empregados, indicando uma relação entre a pré-exposição uterina e luteólise prematura (ciclo curto).

Tendo em vista os dados discutidos acima, a capacidade esteroidogênica do folículo dominante e CL resultante parecem ser mais influenciados pela maior duração do proestro do que o diâmetro ou idade do folículo no momento do pico de LH. Menor duração do proestro pode ser responsável pelo desenvolvimento uterino inadequado, gerando falhas gestacionais diretas por não proporcionar um ambiente uterino ideal para o embrião, levando a sua morte, ou indiretamente, por não dar o suporte necessário ao crescimento embrionário, levando à diminuição do tamanho do concepto e conseqüente falha no processo de reconhecimento materno da gestação.

## **2.8. Efeito da progesterona pós-IA**

A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária, sendo a  $P_4$  importante por controlar mudanças no útero e influenciar o crescimento embrionário (MANN & LAMMING, 1999).

Em ruminantes, o principal sinal para o reconhecimento materno da gestação é feito através da secreção de interferon-tau (IFN- $\tau$ , FARIN et al., 1990). Há uma alta correlação entre as concentrações de progesterona na circulação e a secreção de IFN- $\tau$  pelo embrião, sendo que, o atraso no aumento das concentrações de progesterona, durante o início da fase lútea após a inseminação, está relacionado ao

menor desenvolvimento embrionário e menor secreção de IFN- $\tau$  (MANN & LAMMING, 2001), com posterior aumento da liberação de PGF $_2\alpha$ .

Após o reconhecimento materno da gestação, o histotrófo tem grande importância para o desenvolvimento do embrião, 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, desenvolvimento morfológico do conceito, a produção de IFN- $\tau$  e a secreção de proteínas uterinas (GARRET et al., 1988)

A progesterona é essencial para o adequado desenvolvimento do conceito, e maiores taxas de prenhez foram verificadas quando a concentração desse hormônio foi superior (MUSSARD et al., 2007, BRIDGES et al., 2010, PERRY et al., 2005). Vasconcelos et al. (2001) e Sartori et al. (2006) observaram maior taxa de prenhez em vacas leiteiras que ovularam folículos maiores, associando o aumento fertilidade ao maior tamanho do corpo lúteo e concentração de P $_4$ .

Posteriormente, Peres et al. (2009) verificaram que o diâmetro do folículo no momento da IATF e a administração de eCG em novilhas Nelore esteve positivamente correlacionada com aumento da concentração de P $_4$  sete dias após a ovulação (0 UI: 2,77 $\pm$ 0,11 ng/ml; 200 UI: 3,81 $\pm$ 0,11 ng/ml e 300 UI: 4,87 $\pm$ 0,11 ng/ml; p<0,05) com subsequente aumento na taxa de concepção. Baruselli et al. (2004) e Sá Filho et al. (2010a) observaram efeitos similares após tratamento com eCG. Embora, esses autores tenham correlacionado maior taxa de prenhez a IATF com elevadas concentrações de P $_4$  após a indução da ovulação de folículos de maior diâmetro. Demetrio et al. (2007) avaliando os fatores que afetam a fertilidade de receptoras de embrião Holandesas, não notaram efeito das concentrações de P $_4$  no momento da transferência de embrião (TE), na taxa de concepção desses animais. Nogueira et al. (2003) observaram que o aumento das concentrações de P $_4$  através da indução de CL acessório com eCG, resultou em decréscimo na taxa de prenhez de receptoras de embrião cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Adicionalmente, Sartori et al. (2006) verificaram que a taxa de prenhez de vacas com folículo entre 10 e 15 mm foi superior em vacas Holandesas que receberam TE quando comparado a IATF.

Esses dados em conjunto sugerem que não é simplesmente as concentrações de P $_4$  elevada após a IATF que está relacionada com maior taxa de prenhez e possivelmente este fator pode ser apenas consequência da indução da ovulação de folículos maiores que resultam em maior fertilidade devido as maiores concentrações

de E<sub>2</sub> pré-ovulatório, maturidade oocitária e ambiente uterino adequado (VASCONCELOS et al., 2001 e MUSSARD et al., 2007).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS, G.P. et al. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267-275, 1993.

ADAMS, G. P. et al. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 627 - 640, 1992.

AHMAD, N. et al. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 13 -28, 1997.

AHMAD, N et al. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1129 - 1135, 1995.

ANUALPEC 2011. Anuário da Pecuária Brasileira, 2011, Instituto FNP, São Paulo.

ASBIA. 2010. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. 2010. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/download/mercado/relatorio2010.pdf>> Acesso em 12/10/2011.

AUSTIN, E. J. et al. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2219 - 2226, 1999.

BASTOS, M. R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P.; SURJUS, R.S.; GUARDIEIRO, M.M.; FERREIRA, J.C.P.; MOURÃO, G.B.; PIRES, A.V.; BIEHL, M.V.; PEDROSO, A.M.; SANTOS, F.A.P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES 2011. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38 (Suplemento 2). p. 776, 2010, Porto de Galinhas – PE.

BARUSELLI, P.S.; et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: **International Congress on Animal Reproduction**, 2004.

BERGFELD, E. G. M. et al. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 $\beta$ -estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 546 - 553, 1996.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.93, p. 3578-3587, 2010.

BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; KNIGHT, P. G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrus cycle. **Reproduction**, v. 127, p. 621 - 629, 2004.

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

BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31–40, 1995.

BRIDGES, G. A. et al. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 208 - 215, 2010.

BRIDGES, G. A. et al. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, p. 843 – 851, 2008.

BURKE, C. R. et al. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v. 60, p. 647 – 658, 2003.

BURKE, C. R. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 161 – 174, 2001

BURKE, C. R.; BOLAND, M. P.; MACMILLAN, K. L. Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 23 – 33, 1999.

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

CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167 – 175, 2008.

CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers, **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 189 – 196, 2006.

CEPEA-USP/CNA – Centro de Estudos Avançado em Economia Agrícola, Universidade de São Paulo e Confederação Nacional da Agricultura. 2011. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib>> Acesso em 12/11/2011.

CERRI, R. L. A. et al. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 87, p. 3704 - 3715, 2004.

CERRI, R. L. A. et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. **Journal Dairy Science**. v. 94, p. 3342 - 335, 2011a.

CERRI, R. L. A. et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle II. Ovarian and uterine reponses. **Journal Dairy Science**. v. 94, p. 3352 - 3365, 2011b.

CERRI, R. L. A. et al. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**. v. 137, p. 813 - 823, 2009.

COLAZO, M. G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 109 – 117, 2008.

DAY, M. L.; 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, 2006.

DEMETRIO, D.G.B. et al. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal Dairy Science**. v 90; p: 5073-5082; 2007.

DIAS, F. C. F. et al. Effect of length progesterone exposure during ovulatory wave development on pregnancy rate. **Theriogenology**, in press, 2011

DIAS, C. C. et al. Progesterone concentrations, exogenous eCG and timing of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 378 – 385, 2009.

FARIN, C. E. et al. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 210 - 218, 1990.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489 - 1505, 1997.

GARRETT, J. E. et al. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 437 - 446, 1988.

GEARY T. W. et al. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or Co-Synch protocol. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1 – 4, 2001.

GEISERT, R. D. et al. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, p. 11 - 25, 1988.

GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852 - 858, 2008.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187 – 1194, 1996.

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

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 95 - 100, 1980.

KOJIMA, F. N. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 187 - 211, 2003.

LAMB, G. C. et al. Synchronization of estrous and artificial insemination in replacement beef heifers using GnRH, PGF2 $\alpha$  and progesterone. **Journal Animal Science**, v. 84, p. 3000 - 3009, 2006.

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

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

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 269 - 274, 1999.

MARTINEZ, M. F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 1049 - 1059, 2002a.

MARTINEZ, M. F. et al. The use of a progesterone releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed time AI in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1746 - 1751, 2002b.

MARTINEZ, M. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 757 – 769, 2000.

MANTOVANI, A.P. et al. Follicular growth and plasma progesterone patterns in Bos indicus x Bos Taurus heifers submitted to different PGF<sub>2</sub> $\alpha$ /progesterone-based synchronization protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p.91 - 96, 2010.

MANTOVANI, A.P. et al. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR<sup>®</sup>) for induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p.272 - 277, 2005.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cattle: I. Basis for development of protocols. **Theriogenology** , v. 72, p. 179 – 189, 2009.

MIHM, M. et al. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 123 - 130, 1994.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 535 - 536, 1976a.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W. Progesterone and oestrogen requirements for the survival of embryos in the ovariectomized ewe. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 536 - 537, 1976b.

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

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

MUSSARD, M. L. et al. Influence of premature induction of luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 937 - 943, 2007.

MUSSARD, M. L. et al. Ovulatory response, luteal function and fertility in cattle induced to ovulate dominance follicles of early or late maturity. **Biology of Reproduction**, v. 68, (Supplement 1), p. 332, (Abstract 535), 2003a.

MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: Proceedings of the Animal Conference of the Society for **Theriogenology**, p. 179, 2003b.

NETT, T. M. et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 33 – 42, 2002.

NOGUEIRA, M. F. G. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo transfer recipients synchronized with PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and eCG? **Theriogenology**, v. 61, p. 1283 – 1290, 2004.

PERES, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination **Theriogenology**, v. 72, p. 681 – 689, 2009.

PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifer. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 684 - 689, 2007.

PERRY, G. A. et al. Relationship between follicle size pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 5268 - 5273, 2005.

PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 1197 – 1204, 2003.

PINHEIRO, O. L. et al. 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. M.; MEE, O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.

RAHE, C. H. et al. 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.; BUTLER, R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 39 - 47, 1996.

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. et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p. 455 – 463, 2011.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010 a.

SÁ FILHO, M.F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 23 - 30, 2010b.

SÁ FILHO, O.G. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle: II. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210 - 218, 2009.

SANTOS, J. E. et al. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 93, p. 2976 - 2988, 2010.

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

SARTORI, R. et al. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**. v. 65, p. 1311 - 1321, 2006.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal Dairy Science**, v. 87, 905 - 920, 2004.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1203-1409, 2001.

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382 – 2394, 2005.

SAVIO, J. D. et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with

a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 77 - 84, 1993.

SHAHAM - ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of progesterone concentration on bovine uterine PGF2 $\alpha$  secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, p. 643 – 648, 2001.

SOUZA, A.H et al. Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.90, p. 4623-4634, 2007.

STEVENSON, J.L. et al. Effect of synchronization protocols on follicular development and estradiol and progesterone concentrations of dairy heifers. **Journal Dairy Science**, v.91, p. 3045-3056, 2008.

TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E. K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2985 - 2991, 1996.

THATCHER, W. et al. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 27 - 49, 1993.

TURZILLO, A. M.; MILLER, M. W.; NETT, T. M. Pulsatile GnRH increases concentrations of GnRH receptor mRNA and numbers of GnRH receptors during luteolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 418 – 423, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. 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. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1067 – 1078, 1999.

## **CAPÍTULO 2**

Efeitos das concentrações de progesterona, duração do proestro e diâmetro folicular sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore submetidas à inseminação artificial após detecção do estro ou inseminadas em tempo fixo.

**Efeitos das concentrações de progesterona, duração do proestro e diâmetro folicular sobre a taxa de concepção de novilhas Nelore submetidas à inseminação artificial após detecção do estro ou inseminadas em tempo fixo**

**RESUMO**

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito das concentrações de progesterona no desenvolvimento folicular e a influência do diâmetro folicular e duração do proestro na concepção de novilhas púberes inseminadas após detecção de cio ou submetidas à IATF. No exp.1, 723 novilhas foram sincronizadas com o protocolo: D0: benzoato de estradiol (BE, 2,0 mg, Estrogin<sup>®</sup>) + CIDR<sup>®</sup>; D7: dinoprost trometamina (PGF2 $\alpha$ , 12,5 mg, Lutalyse<sup>®</sup>). As novilhas foram distribuídas aleatoriamente no dia 0 para inserção de CIDR<sup>®</sup> sem utilização prévia (CIDR1) ou utilizado previamente por 18 dias (CIDR3) e retirada no dia 7 ou dia 9 seguido de detecção de cio e inseminação 12h após o cio. No exp.2, 1083 novilhas foram sincronizadas de acordo com o exp1, entretanto todos dispositivos foram removidos no dia 9 e os animais foram inseminados 48 h (0,5 mg, i.m., ECP<sup>®</sup> no dia 9), 54 ou 72 h (100  $\mu$ g, im., Fertagyl<sup>®</sup> no dia da IATF). No exp.3 474 novilhas foram distribuídas aleatoriamente para receberem: D-1: 2mg de BE no grupo 3; D0: 1 e 2 mg de BE respectivamente nos grupos 1 e 2. Todas novilhas foram sincronizadas com CIDR1, receberam 12,5 mg de PGF2 $\alpha$  no dia 7 e 0,5 mg de ECP no dia 9. No grupo 2 foi aplicado 200 UI de eCG no dia 9. As novilhas foram inseminadas 48 horas após a remoção do dispositivo, perfazendo assim 3 grupos experimentais: grupo 1 (1 mg de BE no D0), grupo 2 (200 UI de eCG no D9) e grupo 3 (CIDR por 10 dias). Nos exp.1 e 2 o diâmetro do maior folículo ( $\emptyset$ FD) e amostras de sangue (P<sub>4</sub>) foram obtidas em um subgrupo de animais no dia 7 e dia 9. No dia da IA e IATF foi feita avaliação do  $\emptyset$ FD em um subgrupo de animais no exp.3 e em todos animais no exp1 e 2. Amostras de sangue para dosagem de P<sub>4</sub> foram colhidas 7 dias após a IA ou IATF em um subgrupo de animais do exp.1 e em todos animais nos exp.2 e exp3. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a inseminação. Variáveis contínuas foram avaliadas pelo PROC MIXED e binárias pelo PROC GLIMMIX. Considerou-se efeito significativo quando P<0,05 e tendência quando P<0,1. No exp1. novilhas tratadas com CIDR<sup>®</sup> sem utilização prévia apresentaram maior concentração de P<sub>4</sub>d7 (CIDR1: 4,41  $\pm$  0,13 vs. CIDR3: 3,00  $\pm$  0,13 ng/ml). A P<sub>4</sub>d7 afetou negativamente o  $\emptyset$ FD no D7 (CIDR1: 6,46  $\pm$  0,11 vs. CIDR3: 7,16  $\pm$  0,12 mm). Novilhas que permaneceram com CIDR por 9 dias apresentaram maior concentração

de P<sub>4</sub>d<sub>9</sub> (D7: 0,68 ± 0,07 vs. D9: 2,38 ± 0,07 ng/ml) e menor ØFD no dia 9 (D7: 8,61 ± 0,16 vs. D9: 7,91 ± 0,15 mm). Não houve efeito de tratamento na taxa de detecção de cio (67,36%; 487/723). O momento do cio foi afetado pelo tipo de dispositivo (CIDR1: 3,65 ± 0,08 vs. CIDR3: 3,00 ± 0,08 dias) e momento da retirada do implante (D7: 3,76 ± 0,08 vs. D9: 2,90 ± 0,07 dias). Novilhas tratadas com CIDR3 apresentaram maior ØFD no dia da IA (CIDR1: 11,52 ± 0,10 vs CIDR3: 12,13 ± 0,10 mm), entretanto o ØFD-IA não interferiu na taxa de concepção (TC). O momento da remoção do CIDR afetou a TC: (D7: 57,14%; 128/224 vs. D9: 65,78%; 173/263) e a taxa de prenhez TP: (D7: 37,54%; 128/341 vs. D9: 45,29%; 173/382). O tipo de dispositivo interferiu na concentração de P<sub>4</sub> 7 dias após a IA (CIDR1: 4,28 ± 0,17 vs CIDR3: 5,00 ± 0,22 ng/ml) porém não houve efeito na TC. No exp.2 houve efeito do tipo de CIDR na concentração de P<sub>4</sub> no dia 7 (CIDR1: 6,61 ± 0,27 vs. CIDR3: 4,77 ± 0,27 ng/ml), dia 9 (CIDR1: 4,31 ± 0,11 vs. CIDR3: 2,86 ± 0,11 ng/ml) e pós IATF (CIDR1: 3,62 ± 0,09 vs CIDR3: 3,97 ± 0,09 ng/ml). O número de usos do CIDR interferiu no ØFD do dia 7 (CIDR1: 6,84 ± 0,13 vs. CIDR3: 7,60 ± 0,13 mm), dia 9 (CIDR1: 8,53 ± 0,40 vs CIDR3: 9,62 ± 0,40 mm) e dia da IATF (CIDR1: 11,20 ± 0,10 vs. CIDR3: 11,65 ± 0,11 mm). A taxa de ovulação foi afetada pelo número de usos do CIDR (CIDR1: 82,78%; 444/535 vs. CIDR3: 87,98%; 482/548) e momento da IATF (48h: 82,60%; 298/360, 54h: 83,76%; 300/358 e 72h: 89,76%; 328/365). Não houve efeito do número de usos do CIDR e momento da IATF na TC (43,63%; 404/926) e TP (37,30%; 404/1083), contudo a probabilidade de concepção foi influenciada de maneira quadrática pelo ØFD-IATF e de forma linear pela P<sub>4</sub> pós IATF. No exp3. não houve efeito dos grupos no ØFD-IATF (10,53 ± 0,22). Houve efeito dos grupos na taxa de ovulação (grupo 1: 85,36%; 129/151, grupo 2: 94,68%; 153/162 e grupo3: 80,58% 130/161) e níveis de P<sub>4</sub> pós IATF (grupo 1: 3,84 ± 0,15, grupo 2: 4,47 ± 0,14 e grupo 3: 3,77 ± 0,15 ng/ml). A probabilidade de concepção foi influenciada de forma linear pelo ØFD-IATF e de maneira quadrática pela P<sub>4</sub> pós IATF. Houve tendência do tratamento interferir na taxa de prenhez (grupo1: 35,10%; 53/151, grupo2: 38,27%; 62/162 e grupo3: 26,71%; 43/161). Os dados desse estudo permitem concluir que as concentrações e o tempo de exposição a P<sub>4</sub> modulam o desenvolvimento folicular. Novilhas com folículos entre 11 e 14 mm no momento da IATF apresentaram maior taxa de concepção.

**Palavras chave:** progesterona, IATF, novilhas nelore, proestro

**Effect of progesterone concentration, duration of proestrus and follicular diameter on the conception rate in Nelore heifers subjected to artificial insemination after detection of estrus or inseminated at fixed time.**

**ABSTRACT**

The aim of this trial was to evaluate the effect of progesterone concentration in follicular development and influence of follicular diameter and length of proestrus in the conception rate of pos pubertal heifers inseminated after detection of estrus or submitted to TAI. In exp.1, 723 heifers were synchronized with the protocol: D0: estradiol benzoate (EB, 2.0 mg, Estrogin<sup>®</sup>) + CIDR<sup>®</sup>; D7: dinoprost trometamina (PGF2 $\alpha$ , 12.5 mg, Lutalyse<sup>®</sup>). The heifers were randomly assigned on D0 for inserting CIDR<sup>®</sup> without prior use (CIDR1) or previously used for 18 days (CIDR3) and were withdraw on day 7 or day 9 followed by heat detection and insemination 12 hours after estrus. In exp.2, 1083 heifers were synchronized according to exp1, however all devices were removed in day 9 and the animals were inseminated 48h (0.5 mg, i.m., ECP<sup>®</sup> on day 9), 54 ou 72 h (100  $\mu$ g, im., Fertagyl<sup>®</sup> on day TAI). In exp.3, 474 heifers were randomly assigned to receive: D-1: 2 mg of EB in group 3; D0: 1 and 2 mg of EB respectively in groups 1 and 2. All heifers were synchronized with CIDR1, received 12.5 mg of PGF2 $\alpha$  on day 7 and 0.5 mg of ECP on day 9. In the group 2 was administered 200 UI of eCG on day 9. The heifers were inseminated 48 hours after device removal, so three experimental groups were formed: group 1 (1 mg of EB on D0), group 2 (200 UI of eCG on D9) and group 3 (CIDR for 10 days). In the exp.1 and 2 the diameter of the largest follicle ( $\emptyset$ FD) and sample of blood (P<sub>4</sub>) were obtained of subset of animals on day 7 and day 9. On days of AI and TAI the diameter of the largest follicle ( $\emptyset$ FD) was measured in the subset of animals in the exp.3 and all animals in the exp.1 and exp.2. Blood samples for P<sub>4</sub> assays were harvested seven days after AI or TAI in subset of animals the exp.1 and all heifers the exp.2 and exp.3. Pregnancy diagnosis was performed 40 days after insemination. Continuous variables were analyzed using PROC MIXED and PROC GLIMMIX for binary. Effect was considered significant when P<0.05 and trends at P<0.1. In exp.1 heifers treated with CIDR<sup>®</sup> without prior use had higher concentration of P<sub>4</sub>d7 (CIDR1: 4.41  $\pm$  0.13 vs. CIDR3: 3.00  $\pm$  0.13 ng/ml). The P<sub>4</sub>d7 negatively affected  $\emptyset$ FD on D7 (CIDR1: 6.46  $\pm$  0.11 vs. CIDR3: 7.16  $\pm$  0.12 mm). The heifers that remained with CIDR for 9 days had higher concentration P<sub>4</sub>d9 (D7: 0.68  $\pm$  0.07 vs. D9: 2.38  $\pm$  0.07 ng/ml) and smaller  $\emptyset$ FD

on day 9 (D7:  $8.61 \pm 0.16$  vs. D9:  $7.91 \pm 0.15$  mm). There was no treatment effect on heat detection rate (67.36%; 487/723). The moment of estrus was affected by type of device (CIDR1:  $3.65 \pm 0.08$  vs. CIDR3:  $3.00 \pm 0.08$  days) and time of withdraw device (D7:  $3.76 \pm 0.08$  vs. D9:  $2.90 \pm 0.07$  dias). Heifers treated with CIDR3 had a larger  $\emptyset$ FD on the AI (CIDR1:  $11.52 \pm 0.10$  vs CIDR3:  $12.13 \pm 0.10$  mm), however the  $\emptyset$ FD-IA did not affected the conception rate (CR). The time of CIDR removal affected the CR: (D7: 57.14%; 128/224 vs. D9: 65.78%; 173/263) and pregnancy rate RP: (D7: 37.54%; 128/341 vs. D9: 45.29%; 173/382). The device interfered with the concentration of P<sub>4</sub> seven days after AI (CIDR1:  $4.28 \pm 0.17$  vs CIDR3:  $5.00 \pm 0.22$  ng/ml) but had no effect on TC. In the exp.2 the CIDR affected the P<sub>4</sub> concentration on day 7 (CIDR1:  $6.61 \pm 0.27$  vs. CIDR3:  $4.77 \pm 0.27$  ng/ml), on day 9 (CIDR1:  $4.31 \pm 0.11$  vs. CIDR3:  $2.86 \pm 0.11$  ng/ml) and after TAI (CIDR1:  $3.62 \pm 0.09$  vs CIDR3:  $3.97 \pm 0.09$  ng/ml). The CIDR also affected the diameter of largest follicle on day 7 (CIDR1:  $6.84 \pm 0.13$  vs. CIDR3:  $7.60 \pm 0.13$  mm), day 9 (CIDR1:  $8.53 \pm 0.40$  vs CIDR3:  $9.62 \pm 0.40$  mm) and at TAI (CIDR1:  $11.20 \pm 0.10$  vs. CIDR3:  $11.65 \pm 0.11$  mm). Ovulation rate was affected by number of CIDR uses (CIDR1: 82.78%; 444/535 vs. CIDR3: 87.98%; 482/548) and moment of TAI (48h: 82.60%; 298/360, 54h: 83.76%; 300/358 e 72h: 89.76%; 328/365). There was no effect of number of uses of CIDR and moment of TAI on CR (43.63%; 404/926) and PR (37,30%; 404/1083), but the likelihood of conception was influenced by  $\emptyset$ FD-TAI in quadratic way and by P<sub>4</sub> after TAI in linear way. In exp.3 there was no difference of  $\emptyset$ FD-TAI between the groups ( $10.53 \pm 0.22$ ). The groups affected the ovulation rate (group 1: 85.36%; 129/151, group 2: 94.68%; 153/162 and group 3: 80.58% 130/161) and levels of P<sub>4</sub> after TAI (group 1:  $3.84 \pm 0.15$ , group 2:  $4.47 \pm 0.14$  and group 3:  $3.77 \pm 0.15$  ng/ml). The likelihood of conception was influenced linearly by  $\emptyset$ FD-TAI and quadratic way by P<sub>4</sub> after TAI. There was a trend of treatment interfere in pregnancy rate (group1: 35.10%; 53/151, group2: 38.27%; 62/162 and group3: 26.71%; 43/161). The data from this study support the conclusion that progesterone levels and time of exposure to progesterone modulate the follicular development. Heifers with follicles between 11 and 14 mm at TAI had better conception rate.

**Key words:** progesterone, TAI, Nelore heifers, proestrus.

## 1. INTRODUÇÃO

A IATF é uma tecnologia que possibilita o aumento da taxa de serviço eliminando as falhas de detecção de cio, principalmente em fêmeas *Bos indicus* (PINHEIRO et al., 1998) e permite a inseminação de vacas em anestro (MENEGETTI et al., 2009). Contudo, a concepção em novilhas Nelore púbere submetida a protocolos de IATF não é equivalente às observadas nos sistemas que utilizam a detecção de estro (DIAS et al., 2009).

As causas desta menor fertilidade podem estar relacionadas à interferência dos altos níveis de progesterona, que reduzem o diâmetro folicular a IATF (DIAS et al., 2009 e PERES et al., 2009), resultando em folículos imaturos que podem comprometer tanto a qualidade do oócito quanto o ambiente uterino gerado durante o proestro (BRIDGES et al., 2010) devido as menores concentrações de  $E_2$  pré-ovulatório (PERRY et al. 2005 e 2007). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a interferência das concentrações de  $P_4$  durante o desenvolvimento folicular em novilhas submetidas ao protocolo de sincronização, e a influência do diâmetro folicular e duração do proestro na fertilidade de animais submetidos à inseminação artificial convencional ou em tempo fixo.

As hipóteses desse trabalho são: 1) as concentrações de progesterona e o tempo de exposição à progesterona, não interferem na taxa de concepção de novilhas submetidas à inseminação artificial após a detecção do estro, 2) a concentração de progesterona durante o protocolo de sincronização limita o desenvolvimento folicular, entretanto o aumento da duração do proestro ou a administração de estradiol exógeno incrementa a taxa de concepção desses animais e 3) sob alta concentração de progesterona, o emprego de uma dose reduzida de benzoato de estradiol ou o atraso da retirada do dispositivo de progesterona, proporciona taxa de concepção similar ao uso de 200 UI de eCG no dia da remoção do implante.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Experimento 1

#### 2.1.1. Local experimental, animais e tratamentos

Foram avaliadas 1200 novilhas Nelore de 24 a 29 meses de idade, sendo mantidas 723 animais que possuíam um CL visível em um dos dois exames ultrasonográficos realizados 20 a 30 dias antes do início do protocolo (dia 0). As novilhas com escore de condição corporal de  $3,01 \pm 0,24$  (escala de 1 a 5; LOWMAN et al. 1976) pertenciam a Fazenda Raça situada no município de Cana Brava do Norte – MT, Brasil. As novilhas foram mantidas a pasto (*Brachiaria brizantha*), com água e sal mineral à vontade, divididas em 6 lotes de manejo.

Todos os animais foram sincronizados utilizando-se o seguinte protocolo: dia 0: administração de benzoato de estradiol (BE, 2 mg, i.m., Gonadiol<sup>®</sup>, Intervet Schering-Plough, Brasil), inserção de um dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> sem utilização prévia (1<sup>o</sup> uso - CIDR<sup>®</sup>, 1,9 g, Pfizer Saúde Animal, Brasil - CIDR1) ou utilizado previamente por 18 dias (3<sup>o</sup> uso - CIDR3), classificação de ECC (escala de 1 a 5, Lowman et al., 1976) e dia 7: aplicação de prostaglandina (12,5 mg, i.m., Lutalyse<sup>®</sup> - Pfizer Saúde Animal, Brasil). As novilhas de cada lote foram distribuídas aleatoriamente para inserção de dispositivos de 1<sup>o</sup> ou de 3<sup>o</sup> uso e retirada no dia 7 ou dois dias depois da aplicação da prostaglandina (dia 9), determinando quatro grupos experimentais: CIDR de 1<sup>o</sup> uso por 7 dias (CIDR1-d7; n= 175) ou 9 dias (CIDR1-d9; n= 189) e CIDR de 3<sup>o</sup> uso por 7 dias (CIDR3-d7;n= 166) ou 9 dias (CIDR3-d9; n=193).

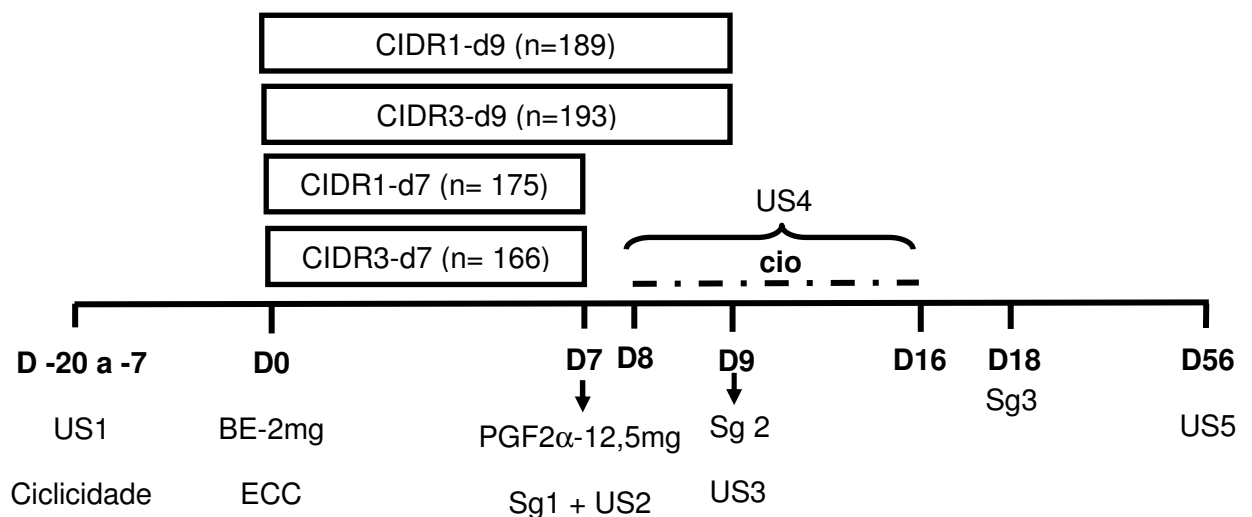
No dias 7 e 9 do protocolo foi feita a colheita de sangue e a avaliação ultrasonográfica do diâmetro do maior folículo através da média dos diâmetros horizontal e vertical de um subgrupo animais (CIDR1-d7, n=96; CIDR3-d7, n=87; CIDR1-d9, n=111 e CIDR3-d9, n=114).

No momento da retirada do dispositivo de P<sub>4</sub>, os animais tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Raidez<sup>®</sup>, Walmur), com objetivo de auxiliar a detecção de cio. Todos os animais permaneceram no mesmo lote e a observação de cio das novilhas cujo dispositivo foi removido no dia 7 foi iniciada no dia seguinte. O procedimento foi realizado por inseminadores treinados durante nove dias consecutivos, duas vezes ao dia, uma no período da manhã 7:30 h às 8:30 h e outra no período da tarde das 16:00 h as 17:00 h. Apenas novilhas detectadas em cio entre os dias 8 e 14 dos grupos CIDR1-d7 e CIDR3-d7, e novilhas detectadas em cio entre

os dias 10 e 16 dos grupos CIDR1-d9 e CIDR3-d9 foram utilizadas no estudo, totalizando sete dias de observação de cio em todos os grupos.

A inseminação foi realizada por um inseminador treinado com sêmen de três touros, divididos aleatoriamente dentro de cada tratamento. Novilhas detectadas em estro pela manhã, foram inseminadas durante o período da tarde, e as detectadas em estro pela tarde, inseminadas pela manhã do dia seguinte, no momento da IA o diâmetro do maior folículo foi avaliado. Em um subgrupo de animais detectados em cio 2,5 dias (CIDR1-d9; n=34 e CIDR3-d9; n=35) e 4,5 dias (CIDR1-d7;n=21 e CIDR3-d7;n=9) após retirada do dispositivo, foi realizada a colheita de sangue sete dias depois do estro.

O diagnóstico de gestação foi avaliado por US (US5) 40 dias após o término da observação de cio. O diagrama esquemático está representado na figura 1 abaixo.



**Figura 1.** Diagrama esquemático do experimento 1: **D -20 a -7:** US1 - avaliação da presença de CL; **D0:** aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do CIDR novo (1º uso) ou previamente utilizado por 18 dias (3º uso); **D7:** aplicação de 12,5 mg de PGF2α em todos animais e retirada de metade dos dispositivos de 1º e 3º uso seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador; Sg1 + US2: coleta de sangue e avaliação do diâmetro do maior folículo de um subgrupo de animais; **D8:** início da observação de cio; **D9:** Sg2 e US3: coleta de sangue e avaliação do diâmetro do maior folículo do mesmo subgrupo do dia 7, retirada do restante dos dispositivos seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador **Cio:** observação de cio por 7 dias e IA após 12 h do início do cio; US4: avaliação do diâmetro do maior folículo no momento da IA; **D16:** término da observação de cio;

**D18:** Coleta de sangue de uma amostragem de animais; **D56:** US5 - diagnóstico de gestação após o término da observação de cio.

### **2.1.2. Exames Ultra-sonográficos**

Os exames ultra-sonográficos (US1, US2, US3, US4 e US5) foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500, com transdutor linear de 7,5 MHz.

### **2.1.3. Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona**

A colheita de sangue foi realizada previamente a retirada do CIDR (d7 e d9), pela veia coccígea em tubos com vácuo sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo na posição vertical e até completar 24 h, mantidas em refrigerador a 4°C. Posteriormente, foram centrifugadas a temperatura ambiente a 1700 X g por 10 minutos, para separação do soro, e armazenadas em freezer a -20°C até a realização das dosagens.

### **2.1.4. Dosagem da progesterona sérica**

As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Araçatuba. 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<sub>4</sub> marcada [I-125] em tubos com anticorpo contra P<sub>4</sub> 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 5 ensaios. O limite de detecção dos ensaios foi de 0,005 ng/ml. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram < 8,3%.

### **2.1.5. Análise Estatística**

As variáveis dependentes contínuas (concentração sérica de progesterona, diâmetro do maior folículo e momento do estro) foram analisadas e correlacionadas

respectivamente com procedimento MIXED e PEARSON do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A fim de determinar os efeitos dos tratamentos nos coeficientes de correlação empregou-se o PROC GLM do SAS. As variáveis dependentes binomiais (taxa de detecção de cio, taxa de concepção e taxa de prenhez) foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do programa SAS. A probabilidade de concepção foi avaliada de acordo com a concentração de  $P_4$  no dia 7, dia 9 ou sete dias após o estro, diâmetro do folículo no momento da IA e momento do estro. O procedimento GLM foi inicialmente usado para avaliar se cada variável interferiu na probabilidade de concepção de maneira linear, quadrática ou cúbica e determinar o efeito dos tratamentos no modelo estatístico. Utilizou-se o PROC LOGISTIC do SAS para gerar os valores de intercept e slope de acordo com probabilidade de máxima concepção, permitindo a construção do gráfico segundo a equação: Probabilidade =  $(e^{\text{equação logística}}) / (1 + e^{\text{equação logística}})$ . Nas análises todas as interações foram testadas e variáveis com  $P > 0,2$  foram removidas do modelo final.

Nas análises que incluíram as variáveis concentração de  $P_4$  e diâmetro folicular nos dias 7 e 9, foram utilizados apenas os dados dos 408 animais pertencentes ao subgrupo avaliado. O mesmo ocorreu nas análises da concentração de progesterona sete dias após a IA (n = 99)

Para análise das variáveis, concentração de  $P_4$  e diâmetro folicular no dia 7 incluí-se no modelo como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$  e ECC como covariável.

Os modelos para análise da concentração de  $P_4$  no dia 9 e sete dias após a IA, diâmetro folicular no dia 9 e IA, momento do estro, taxa de detecção de cio e taxa de prenhez incluiu-se: o número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , dia da remoção do dispositivo, interações e ECC (covariável).

Com o intuito de avaliar os efeitos dos níveis de progesterona no diâmetro folicular no dia 9 correlacionou-se apenas os animais que permaneceram com CIDR por 9 dias.

Para análise da taxa de concepção incluiu-se no modelo como classe: o número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , dia da remoção do dispositivo, interações, touro e ECC (covariável). Com o objetivo de avaliar o efeito do momento do estro na taxa de concepção, determinaram-se duas classes ( $\leq 3,0$  e  $> 3,0$  dias) de acordo com a mediana da distribuição do cio (med = 3,0). Essa variável foi inserida no modelo em uma segunda análise.

Foi realizada uma segunda análise, utilizando o procedimento ANOVA do programa SAS onde os dados dos grupos CIDR1-d7 vs CIDR1-d9 e CIDR3-d7 vs CIDR3-d9 foram testados, com o intuito de avaliar a variação na distribuição de cio (Teste F) entre os tratamentos. A mesma análise foi realizada levando-se em consideração apenas o dia da remoção do dispositivo (dia 7 vs dia 9).

Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P \leq 0,05$  e tendências valores de  $P \leq 0,1$ . Os resultados de todas as análises foram reportados pelas médias dos quadrados mínimos e quando houve tendência ou efeito significativo, as comparações entre as médias de cada tratamento foram feitas através da função PDIFF do SAS.

## **2.2. Experimento 2**

### **2.2.1. Local experimental, animais e tratamentos**

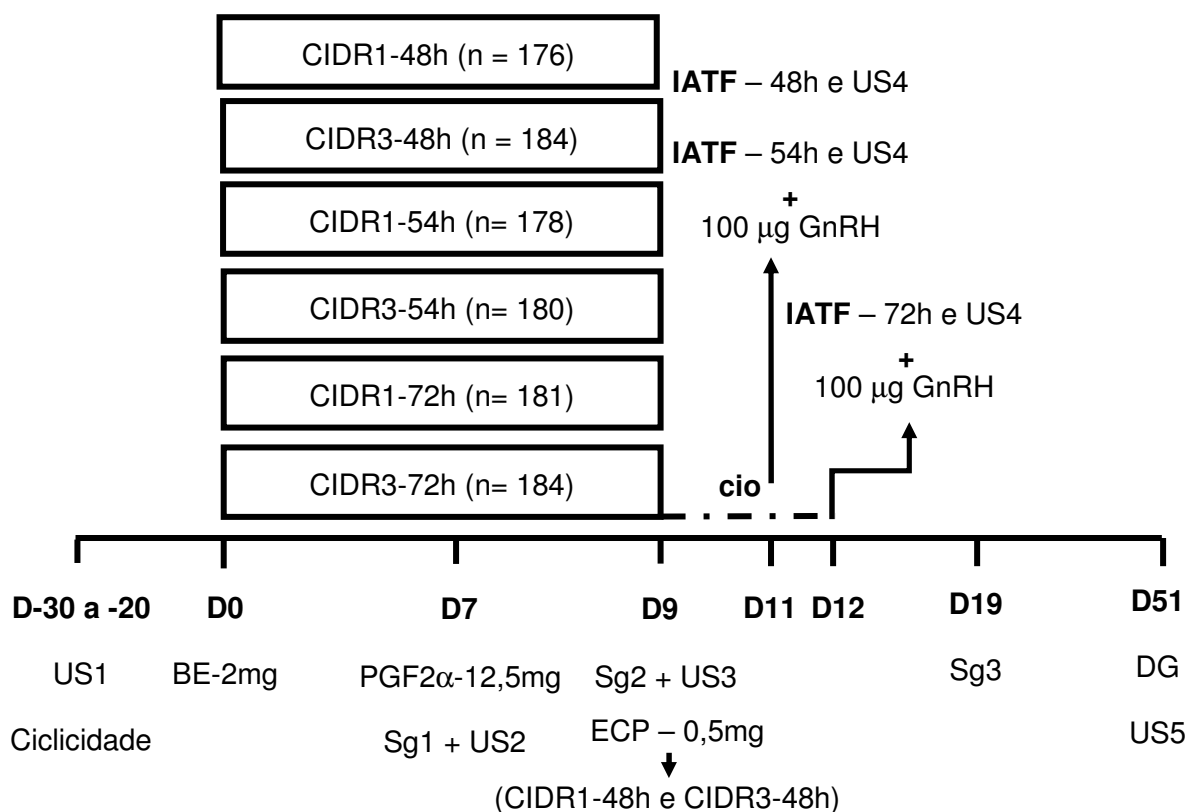
Foram avaliadas 2500 novilhas Nelore de 24 a 29 meses de idade, sendo mantidas 1083 animais que possuíam um CL visível em um dos dois exames ultrasonográficos realizados 20 a 30 dias antes do início do protocolo (dia 0). As novilhas pertenciam a duas propriedades: Fazenda Rancho 60 (n= 570; ECC =  $3,08 \pm 0,26$ ), situada no município de Bom Jesus do Araguaia – MT e Fazenda Santo Antônio (n= 513; ECC =  $2,80 \pm 0,24$ ) localizada no município de Araguaiana - MT. As novilhas foram mantidas a pasto (*Brachiaria brizantha*), com água e sal mineral à vontade, divididas em 4 lotes de manejos na Fazenda Rancho 60 e 3 lotes na Fazenda Santo Antônio.

Todos os animais foram sincronizados utilizando-se o seguinte protocolo: dia 0: administração de benzoato de estradiol (BE, 2 mg, i.m., Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil), inserção de um dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> sem utilização prévia (1° uso - CIDR<sup>®</sup>, 1,9 g, Pfizer Saúde Animal, Brasil – CIDR1) ou utilizado previamente por 18 dias (3° uso – CIDR3), classificação de ECC (escala de 1 a 5, Lowman et al., 1976), dia 7: aplicação de prostaglandina (12,5 mg, i.m., Lutalyse<sup>®</sup> - Pfizer Saúde Animal, Brasil) e dia 9: retirada do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub>. As novilhas de cada lote foram distribuídas aleatoriamente para inserção de dispositivos de 1° ou 3° uso e inseminação em três horários distintos (48h, 54h e 72h) após a retirada do implante, determinando seis grupos experimentais: CIDR de 1° ou 3° uso e IATF 48 horas (CIDR1-48h; n= 176 e CIDR3-48h; n= 184), CIDR de 1° ou 3° uso e IATF 54 horas (CIDR1-54h; n= 178 e CIDR3-54h; n= 180) e CIDR de 1° ou 3° uso e IATF 72 horas (CIDR1-72h; n= 181 e CIDR3-72h; n= 184).

Os grupos inseminados com 48 horas receberam cipionato de estradiol (0,5 mg, im., ECP® - Pfizer Saúde Animal, Brasil) no dia 9. Os grupos (CIDR1-48h e CIDR3-48h) foram adicionados com o intuito de avaliar se a administração do E<sub>2</sub> exógeno permite obter resultados similares aos das novilhas com maior duração do proestro (54h e 72h). Nos demais grupos foi aplicado GnRH ( 100 µg, im., Fertagyl®, Intervet Schering-Plough, Brazil) no momento da IATF. Os touros e inseminadores em cada propriedade foram divididos aleatoriamente no momento da IATF dentro de cada tratamento.

Entre o dia da retirada do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> e a IATF, foi observado a manifestação do estro. O procedimento foi realizado por inseminadores capacitados com o auxílio de tinta vermelha (Raidez®, Walmur) impregnada na base da cauda das novilhas, duas vezes ao dia (manhã e tarde). Na Fazenda Rancho 60, o lote 1 (n = 163) não foi submetido a observação de cio. No dia 9 foi coletado sangue e avaliado por US (US3) o diâmetro do maior folículo através da média dos diâmetros horizontal e vertical de um subgrupo de animais (n=532). Na Fazenda Santo Antônio, as novilhas avaliadas no dia 9 (n=250) também foram submetidas à coleta de sangue e avaliação do diâmetro folicular (US2) no dia 7.

Em todas as novilhas foi avaliado o diâmetro do maior folículo no momento da IATF e realizada a coleta de sangue 7 dias depois do último dia de inseminação. O diagnóstico de gestação (US5) foi feito 40 dias após a IATF. O diagrama esquemático está representado na figura 2 abaixo:



**Figura 2.** Diagrama esquemático do experimento 2: **D-30 a -20:** US1 - avaliação da presença de CL; **D0:** aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do dispositivo intravaginal de progesterona novo (1º uso) ou previamente utilizado por 18 dias (3º uso); **D7:** aplicação de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$ , Sg1 + US2: coleta de sangue e avaliação do diâmetro folicular (n=255); **D9:** aplicação de ECP nos grupo CIDR1-48h e CIDR3-48h; retirada do CIDR seguido de pintura da base da cauda com bastão marcador e observação de cio até o momento da IATF, Sg2 + US3: coleta de sangue e avaliação do diâmetro folicular (n=532); **D11 e D12:** IATF + US4 – avaliação do diâmetro do maior folículo; **D19:** Sg3: coleta de sangue 7 dias depois da IATF; **D51:** US5 - diagnóstico de gestação por ultra-sonografia 40 dias após a IATF.

### 2.2.2. Exames Ultra-sonográficos

Os exames ultra-sonográficos (US1, US2, US3, US4 e US5) foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500, com transdutor linear de 7,5 MHz.

### 2.2.3. Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona

A colheita de sangue sempre foi realizada previamente a retirada do CIDR (dia 7 e dia 9), pela veia coccígea em tubos com vácuo sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo na posição vertical e até completar 12 h, mantidas em refrigerador a 4°C. Posteriormente, foram centrifugadas a temperatura ambiente (1700 X g por 10 minutos) para separação do soro, e armazenadas em freezer a -20°C.

### 2.2.4. Dosagem da progesterona sérica

As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Araçatuba. 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 100 $\mu$ l 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<sub>4</sub> marcada [I-125] em tubos com anticorpo contra P<sub>4</sub> 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 12 ensaios. O limite de detecção dos ensaios foi de 0,04 ng/ml. O coeficiente de variação intra e interensaio foram < 10,9%.

### **2.2.5. Análise Estatística.**

As variáveis dependentes contínuas (concentração sérica de progesterona, diâmetro do maior folículo) foram analisadas e correlacionadas, respectivamente com procedimento MIXED e PEARSON do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A fim de determinar os efeitos dos tratamentos nos coeficientes de correlação empregou-se o PROC GLM do SAS. As variáveis dependentes binomiais (taxa de detecção de cio, taxa de sincronização, taxa de concepção e taxa de prenhez) foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do programa SAS. A probabilidade de concepção foi avaliada de acordo com o diâmetro do folículo no momento da IATF, concentração de P<sub>4</sub> no dia 7, dia 9 ou sete dias após a IATF. O procedimento GLM foi inicialmente usado para avaliar se cada variável interferiu na probabilidade de concepção de maneira linear, quadrática ou cúbica e determinar o efeito dos tratamentos no modelo estatístico. Utilizou-se o PROC LOGISTIC do SAS para gerar os valores de intercept e slope de acordo com probabilidade de máxima concepção, permitindo a construção do gráfico segundo a equação: Probabilidade =  $(e^{\text{equação logística}}) / (1 + e^{\text{equação logística}})$ . Nas análises todas as interações foram testadas e variáveis com P > 0,2 foram removidas do modelo final.

Nas análises que incluíram as variáveis concentração de P<sub>4</sub> e diâmetro folicular nos dias 7 e 9, foram utilizados apenas os dados dos animais pertencentes ao subgrupo avaliado (dia7: n= 250 e dia 9: n= 532). O mesmo ocorreu quando a variável detecção de cio foi analisada ou inserida no modelo (n = 920).

Para análise das variáveis, diâmetro folicular e concentração de progesterona dos dias 7 e 9 inclui-se no modelo como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de progesterona, presença de corpo lúteo (CL) no dia 7, interações e ECC (covariável). No modelo que avaliou o diâmetro do folículo e concentração de P<sub>4</sub> no dia 9 foi inserido a variável fazenda.

Novilhas que apresentaram concentração de P<sub>4</sub> ≥ 1ng/ml dez dias depois da remoção do dispositivo foram consideradas ovuladas. Treze novilhas prenhes apresentaram concentração de P<sub>4</sub> < 1,0 ng/ml e foram consideradas ovuladas. Animais ovulados que apresentaram folículos ≤ 6,2 mm no dia da IATF (Gimenes et

al., 2008), foram considerados ovulados antecipadamente e retiradas da análise do diâmetro do maior folículo no momento da IATF. A proporção de novilhas removidas dos grupos 72 h foi maior ( $p < 0,01$ ) que os demais tratamentos (CIDR1-48h: 7,42% - 10/140; CIDR1-54h: 6,99% - 10/144; CIDR1-72h: 13,35% - 20/160; CIDR3-48h: 8,41% - 13/158; CIDR3-54h: 6,49% - 10/156 e CIDR3-72h: 37,72% - 63/168). Em todas as análises onde a variável diâmetro do maior folículo no momento da IATF foi utilizada, empregou-se apenas as novilhas com folículos  $> 6,2$  mm.

Para análise da taxa de ovulação inclui-se como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , horário da IATF, fazenda, interações e ECC (covariável). A probabilidade de ovulação foi avaliada de acordo com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF.

Para análise do diâmetro do maior folículo no momento da IATF inclui-se como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , horário da IATF, interações e ECC (covariável).

Para análise da variável concentração de progesterona dezoenove dias após a remoção do dispositivo considerou-se apenas as novilhas ovuladas. Foi incluído no modelo como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de progesterona, horário da IATF, fazenda, interações e ECC (covariável).

Para análise da variável taxa de concepção [novilhas prenhe/novilhas ovuladas ( $\geq 1$  ng/ml)] e taxa de prenhez (novilhas prenhe/novilhas tratadas) foram incluídos no modelo: ECC (covariável) e como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , horário da IATF, fazenda, lote, touro, inseminador e interações. Com o intuito de determinar o efeito da variável manifestação de cio na taxa de concepção adicionou-se essa variável em uma segunda análise, nesse momento os dados das novilhas que receberam GnRH e ECP foram avaliados separadamente.

Para análise dos fatores que interferem na manifestação de cio foram inseridos no modelo como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de  $P_4$ , horário da IATF, fazenda, interações e ECC (covariável). Avaliou-se o efeito do diâmetro folicular e da concentração de  $P_4$  no dia 9, sobre a probabilidade de manifestação de cio.

Com objetivo de avaliar o efeito do intervalo entre a detecção do cio e a inseminação ( $n = 151$ ) na taxa de concepção, foram determinados 4 momentos para IA: 0 – 6h, 12 -18h e 24 – 36 h. Essa análise incluiu apenas os animais que receberam GnRH.

Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P \leq 0,05$  e tendências valores de  $P \leq 0,1$ . Os resultados de todas as análises foram reportados pelas médias dos quadrados mínimos e quando houve tendência ou efeito significativo as comparações entre as médias de cada tratamento foram feitas através da função PDIFF do SAS.

## **2.3. Experimento 3**

### **2.3.1. Local experimental, animais e tratamentos**

Foram avaliadas 1830 novilhas Nelore de 24 a 29 meses de idade, sendo mantidas 474 animais que possuíam um CL visível em um dos dois exames ultrassonográficos realizados 20 a 30 dias antes do início do protocolo (dia 0). As novilhas pertenciam a duas propriedades: Fazenda Forquilha (n= 200; ECC =  $3,18 \pm 0,26$ ), situada no município de Sena Madureira – AC e Fazenda Palotina (n= 274; ECC =  $3,29 \pm 0,27$ ) localizada no município de Boca do Acre - AC. As novilhas foram mantidas a pasto (*Brachiaria brizantha*), com água e sal mineral à vontade, divididas em 2 lotes de manejos na Fazenda Forquilha e 2 lotes na Fazenda Palotina.

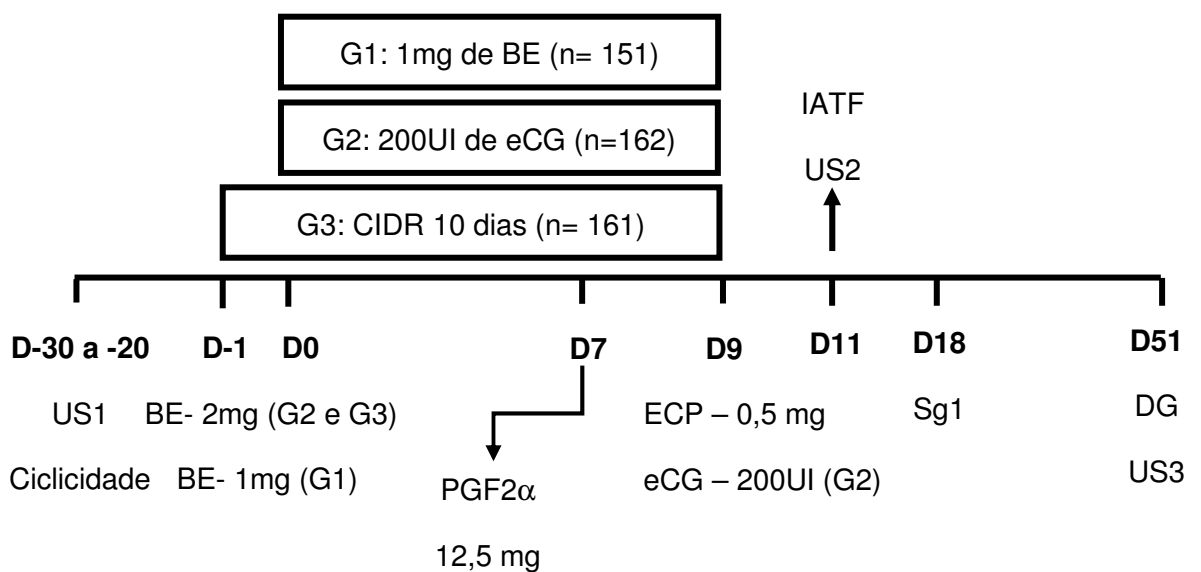
As novilhas de cada lote foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais, perfazendo assim: o grupo 1 que recebeu 1mg de benzoato de estradiol no dia 0 (n = 151), o grupo 2 que recebeu 200 UI de eCG no dia 9 (n = 162) e o grupo 3 que permaneceu com CIDR por 10 dias (n = 161). O grupo 2 funcionou como grupo controle nesse experimento.

No dia - 1 os animais do grupo 3 receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil), inserção de um dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> sem utilização prévia (1<sup>o</sup> uso - CIDR<sup>®</sup>, 1,9 g, Pfizer Saúde Animal, Brasil – CIDR1) e classificação de ECC (escala de 1 a 5, Lowman et al., 1976). Dia 0: Administração de 1mg de BE no grupo 1 e 2 mg no grupo 2, inserção de um dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> sem utilização prévia e classificação de ECC em ambos os grupos

No dia 7 foi feita a aplicação de prostaglandina (12,5 mg, i.m., Lutalyse<sup>®</sup> - Pfizer Saúde Animal, Brasil), dia 9: retirada do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> e aplicação de cipionato de estradiol (0,5 mg, im., ECP<sup>®</sup> - Pfizer Saúde Animal, Brasil). As novilhas do grupo 2 receberam 200 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Intervet Schering Plough). A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo (dia 11).

Em cada propriedade a inseminação foi realizada por inseminadores treinados divididos aleatoriamente no momento da IATF dentro de cada lote. Nas duas fazendas a inseminação foi feita com sêmen do mesmo touro.

No dia IATF em um subgrupo de novilhas (n = 251) foi avaliado o diâmetro do maior folículo através da média dos diâmetros horizontal e vertical (US2). Em todos animais foi realizada a coleta de sangue 7 dias após a IATF. O diagnóstico de gestação (US3) foi feito 40 dias após a IATF. O diagrama esquemático está representado na figura 3 abaixo:



**Figura 3.** Diagrama esquemático do experimento 3: **D-30 a -20:** US1 - avaliação da presença de CL; **D-1:** aplicação de 2 mg de BE (Benzoato de Estradiol) e inserção do dispositivo intravaginal de progesterona novo (CIDR1) no G3; **D0:** aplicação de 1 mg de BE no G1 e 2mg no G2, inserção do CIDR1; **D7:** aplicação de 12,5 mg de PGF2 $\alpha$ ; **D9:** aplicação de 0,5 mg de ECP; administração de 200 UI de eCG no G2, retirada do CIDR; **D11:** IATF e US2: avaliação do diâmetro do maior folículo de um subgrupo de animais (n = 251), **D18:** Sg1: coleta de sangue 7 dias depois da IATF; **D51:** US3 - diagnóstico de gestação por ultra-sonografia 40 dias após a IATF.

### 2.3.2. Exames Ultra-sonográficos

Os exames ultra-sonográficos (US1, US2 e US3) foram realizados com aparelho Aloka, modelo SSD-500, com transdutor linear de 7,5 MHz.

### **2.3.3. Colheita das amostras de sangue para dosagem de progesterona**

O sangue foi colhido da veia coccígea em tubos com vácuo sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo na posição vertical e até completar 12 h, mantidas em refrigerador a 4°C. Posteriormente, foram centrifugadas a temperatura ambiente (1700 X g por 10 minutos) para separação do soro, e armazenadas em freezer a -20°C.

### **2.3.4. Dosagem da progesterona sérica**

As dosagens de progesterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Araçatuba. 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<sub>4</sub> marcada [I-125] em tubos com anticorpo contra P<sub>4</sub> 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 3 ensaios. O limite de detecção dos ensaios foi de 0,04 ng/ml. O coeficiente de variação intra e interensaio foram < 10,9%.

### **2.3.5. Análise Estatística.**

As variáveis dependentes contínuas (concentração sérica de progesterona, diâmetro do maior folículo) foram analisadas e correlacionadas, respectivamente com procedimento MIXED e PEARSON do programa SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A fim de determinar os efeitos dos tratamentos nos coeficientes de correlação empregou-se o PROC GLM do SAS. As variáveis dependentes binomiais (taxa de sincronização, taxa de concepção e taxa de prenhez) foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do programa SAS. A probabilidade de concepção foi avaliada de acordo com o diâmetro do folículo no momento da IATF e concentração de P<sub>4</sub> sete dias após a IATF. O procedimento GLM foi inicialmente usado para avaliar se cada variável interferiu na probabilidade de concepção de maneira linear, quadrática ou cúbica e determinar o efeito dos tratamentos no modelo estatístico. Utilizou-se o PROC LOGISTIC do SAS para gerar os valores de intercept e slope de acordo com probabilidade de máxima

concepção, permitindo a construção do gráfico segundo a equação: Probabilidade =  $(e^{\text{equação logística}}) / (1 + e^{\text{equação logística}})$ . Nas análises todas as interações foram testadas e variáveis com  $P > 0,2$  foram removidas do modelo final.

Nas análises que incluíram a variável diâmetro folicular no dia da IATF foi utilizado apenas os dados dos animais pertencentes ao subgrupo avaliado ( $n= 251$ ).

Novilhas que apresentaram concentração de  $P_4 \geq 1\text{ ng/ml}$  nove dias depois da remoção do dispositivo foram consideradas ovuladas. Uma novilha prenhe apresentou concentração de  $P_4 < 1,0\text{ ng/ml}$  e foi considerada ovulada. Animais ovulados que apresentaram folículos  $\leq 6,2\text{ mm}$  no dia da IATF (Gimenes et al., 2008), foram considerados ovulados antecipadamente e retiradas da análise do diâmetro do maior folículo no momento da IATF. Não houve diferença ( $p > 0,10$ ) na proporção de novilhas ovuladas entre os grupos (Grupo 1: 11,27%; 8/71, Grupo 2: 8,86%; 7/79, Grupo 3: 8,82 6/68). Em todas as análises onde a variável diâmetro do maior folículo no momento da IATF foi utilizada, empregou-se apenas as novilhas com folículos  $> 6,2\text{ mm}$ .

Para análise da taxa de ovulação e diâmetro do maior folículo no momento da IATF inclui-se como classe: grupo, fazenda, interações e ECC (covariável). A probabilidade de ovulação foi avaliada de acordo com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF.

Para análise da variável concentração de progesterona sete dias após a IATF considerou-se apenas as novilhas ovuladas. Foi incluído no modelo como classe: número de utilizações do dispositivo intravaginal de progesterona, horário da IATF, fazenda, interações e ECC (covariável).

Para análise da taxa de concepção [novilhas prenhe/novilhas ovuladas ( $\geq 1\text{ ng/ml}$ )] e taxa de prenhez (novilhas prenhe/novilhas tratadas) inclui-se como classe: grupo inseminador, fazenda, lote, interações e ECC como covariável.

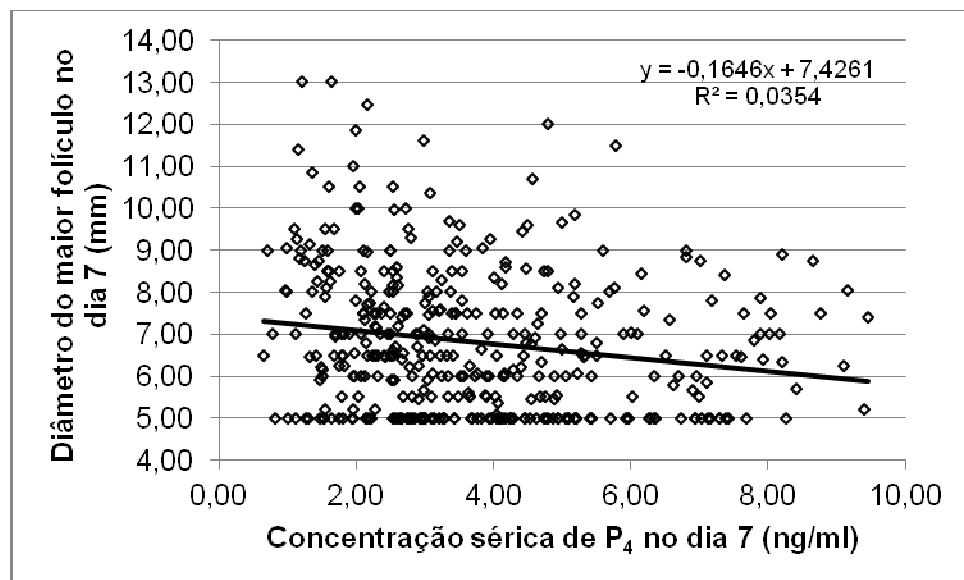
Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P \leq 0,05$  e tendências valores de  $P \leq 0,1$ . Os resultados de todas as análises foram reportados pelas médias dos quadrados mínimos e quando houve tendência ou efeito significativo as comparações entre as médias de cada tratamento foram feitas através da função PDIFF do SAS.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Experimento 1

##### Concentração sérica de progesterona e diâmetro do maior folículo no dia 7

Novilhas que receberam CIDR1 (n= 207) apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior concentração sérica de  $P_4$  e menor diâmetro folicular no dia 7 ( $4,41 \pm 0,13$  ng/ml e  $6,46 \pm 0,11$  mm) comparado aos animais tratados (n= 201) com CIDR3 ( $3,00 \pm 0,13$  ng/ml e  $7,16 \pm 0,12$  mm). Houve efeito ( $p < 0,01$ ) das concentrações de  $P_4$  no diâmetro folicular do dia 7 (figura 4).



**Figura 4:** Correlação entre a concentração sérica de  $P_4$  e diâmetro do maior folículo no dia 7 (n= 408).

##### Concentração sérica de progesterona e diâmetro do maior folículo no dia 9

O número de usos do dispositivo e o dia da retirada do dispositivo interferiram ( $p < 0,01$ ) na concentração sérica de  $P_4$  e diâmetro folicular do dia 9 (tabela 1).

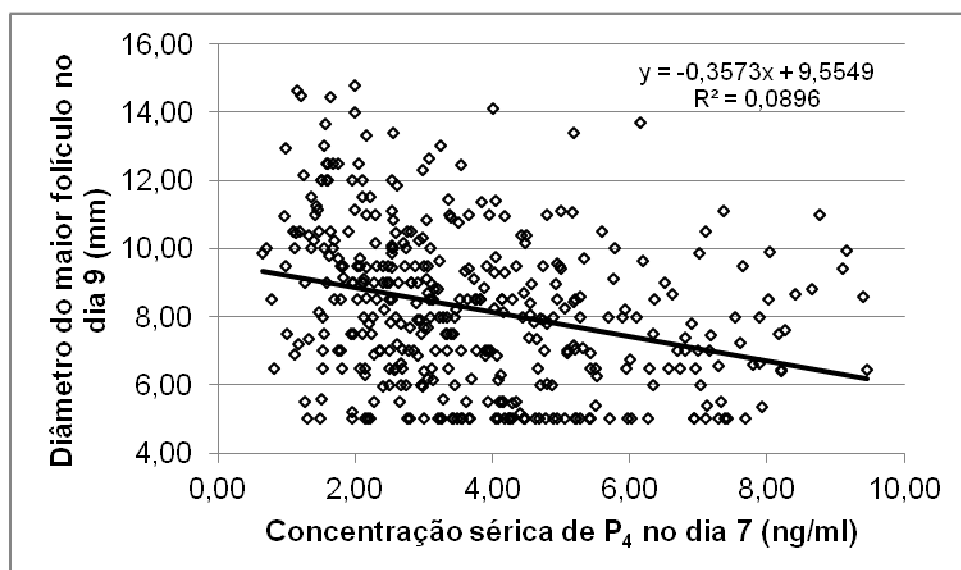
**Tabela 1:** Valores descritivos (média dos quadrados mínimos e erro padrão da média) da concentração sérica de progesterona e diâmetro folicular no dia 9 de 408 novilhas cíclicas.

Efeitos principais	N	Ø folicular no dia 9 (mm) [ ]	de P <sub>4</sub> no dia 9 (ng/ml)
CIDR1	207	7,66 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,83 ± 0,07 <sup>a</sup>
CIDR3	201	8,86 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,07 <sup>b</sup>
dia 7	183	8,61 ± 0,16 <sup>x</sup>	0,68 ± 0,07 <sup>x</sup>
dia 9	225	7,91 ± 0,15 <sup>y</sup>	2,38 ± 0,07 <sup>y</sup>
Tratamentos	N	Ø folicular no dia 9 (mm) [ ]	de P <sub>4</sub> no dia 9 (ng/ml)
CIDR1-d7	96	8,10 ± 0,22	0,65 ± 0,10 <sup>a</sup>
CIDR3-d7	87	9,11 ± 0,23	0,71 ± 0,11 <sup>a</sup>
CIDR1-d9	111	7,21 ± 0,21	3,00 ± 0,10 <sup>b</sup>
CIDR3-d9	114	8,61 ± 0,20	1,76 ± 0,10 <sup>c</sup>

a,b,c – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P < 0,01

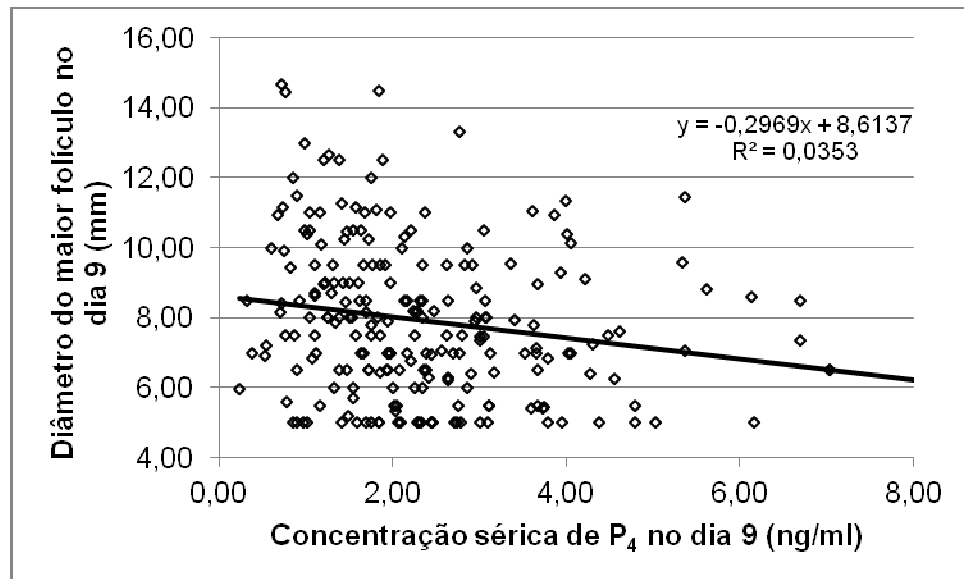
x,y – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P < 0,01

O número de usos do CIDR não interferiu ( $p > 0,10$ ) na proporção de novilhas com concentração sérica de P<sub>4</sub> ≥ 1,0 ng/ml (CIDR1-d7: 21%, 20/96; 1,49±1,25 ng/ml vs CIDR3-d7: 21%, 19/87; 1,91±1,31 ng/ml) no dia 9. Houve efeito ( $p < 0,01$ ) da concentração sérica de P<sub>4</sub> do dia 7 no diâmetro folicular do dia 9 (figura 5).

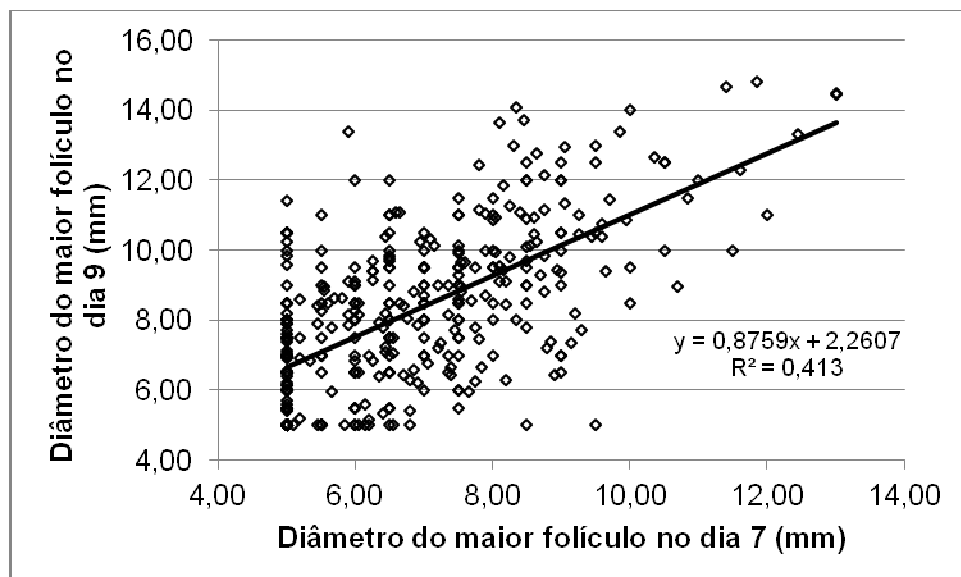


**Figura 5:** Correlação entre a concentração sérica de P<sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 408).

Dentre as novilhas que permaneceram com CIDR por 9 dias, a concentração sérica de  $P_4$  no dia 9 interferiu ( $p < 0,01$ ) no diâmetro folicular do dia 9 (figura 6). O diâmetro folicular no dia 7 foi correlacionado positivamente ( $p < 0,01$ ) com o diâmetro folicular do dia 9 (figura 7).



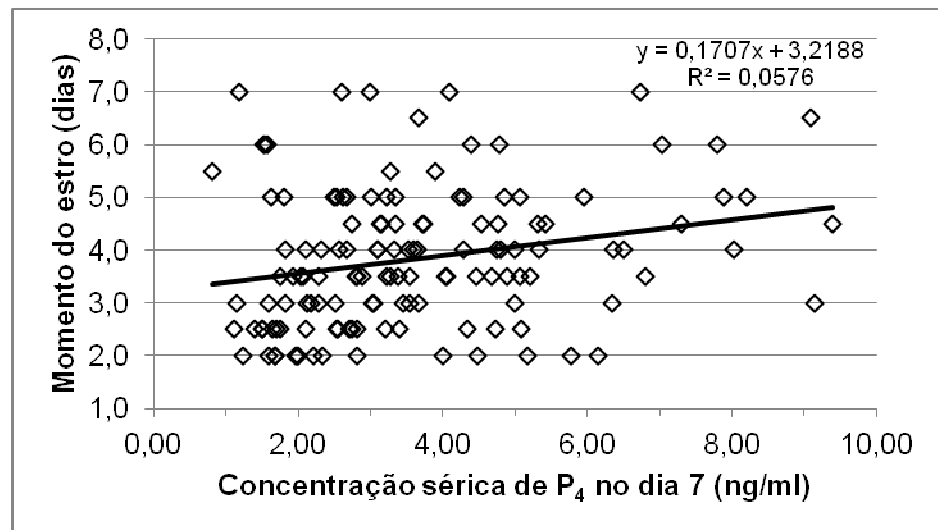
**Figura 6:** Correlação entre a concentração sérica de  $P_4$  e o diâmetro do maior fólculo no dia 9 (n = 225).



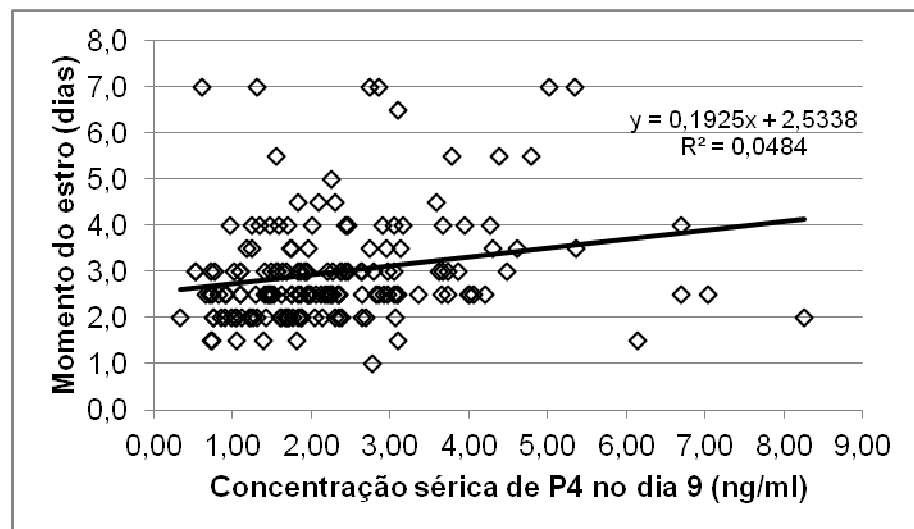
**Figura 7:** Correlação entre o diâmetro do maior fólculo no dia 7 e o diâmetro do maior fólculo no dia 9 (n = 408).

### Manifestação do estro

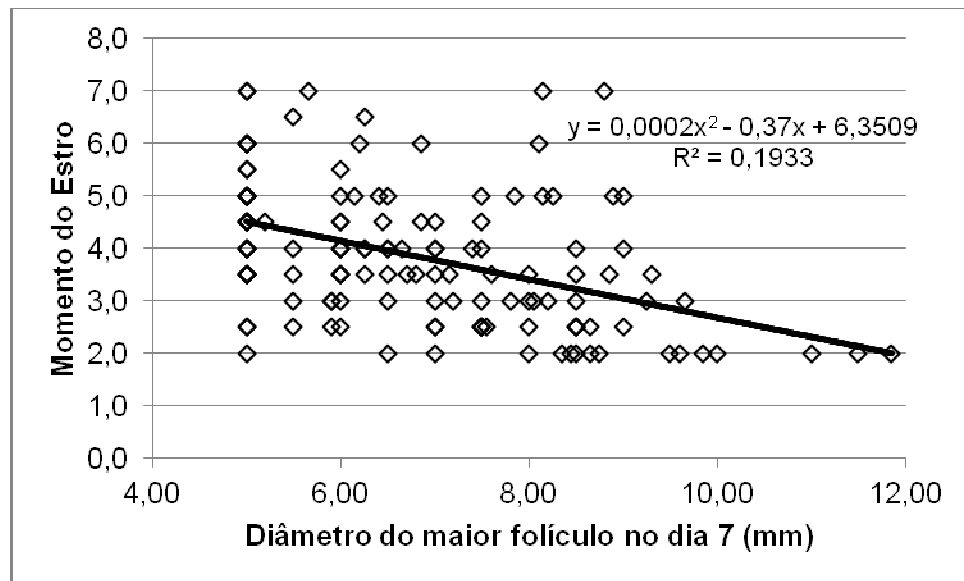
Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do número de prévias utilizações do CIDR, dia da retirada e interações na taxa de detecção de cio (67,36%; 487/723). O número de usos do CIDR e o dia da retirada do dispositivo interferiram ( $p < 0,01$ ) no momento do cio (tabela 2). No dia da remoção do dispositivo, a concentração sérica de  $P_4$  (figuras 8 e 9,  $p < 0,01$ ) e o diâmetro do maior folículo (figuras 10 e 11,  $p < 0,05$ ) interferiram no momento do estro (figuras 10 e 11).



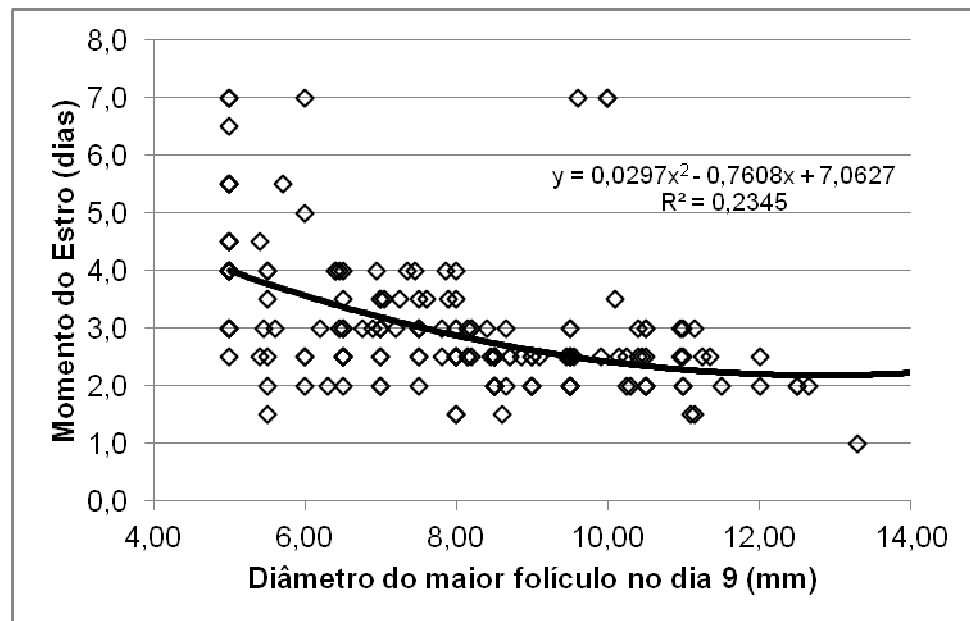
**Figura 8:** Efeito da concentração sérica de  $P_4$  no dia 7 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 7 dias ( $n = 133$ ).



**Figura 9:** Efeito da concentração sérica de  $P_4$  no dia 9 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 9 dias ( $n = 171$ ).



**Figura 10:** Efeito do diâmetro do maior foliculo do dia 7 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 7 dias (n = 133).



**Figura 11:** Efeito do diâmetro do maior foliculo do dia 9 sobre o momento do estro nas novilhas tratadas com CIDR por 9 dias (n = 171).

### **Taxa de Concepção e Diâmetro do foliculo dominante no momento da IA**

O dia da remoção do CIDR interferiu ( $p < 0,05$ ) na taxa de concepção e prenhez (tabela 2). Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do ECC, touro e diâmetro do foliculo na taxa de

concepção. O diâmetro do maior folículo no momento da IA das novilhas com CIDR de 3° uso por 9 dias foi maior ( $p < 0,05$ ), em relação aos demais tratamentos (tabela 2).

**Tabela 2:** Taxa de concepção, taxa de prenhez, momento cio e diâmetro folicular de 487 novilhas cíclicas detectadas em cio. Todos os valores reportados são referente a média dos quadrados mínimos e erro padrão da média.

<b>Efeitos Principais</b>	<b>N</b>	<b>Cio (dias)**</b>	<b>Ø folicular na IA (mm)</b>	<b>Taxa de Concepção (%)</b>	<b>Taxa de prenhez (%)</b>
CIDR1	237	3,65 ± 0,08 <sup>a</sup>	11,52 ± 0,10 <sup>c</sup>	60,76 (144/237)	39,56 (144/364)
CIDR3	250	3,00 ± 0,08 <sup>b</sup>	12,13 ± 0,10 <sup>d</sup>	62,80 (157/250)	43,73 (157/359)
dia 7	224	3,76 ± 0,08 <sup>x</sup>	11,74 ± 0,11	57,14 <sup>c</sup> (128/224)	37,54 <sup>c</sup> (128/341)
dia 9	263	2,90 ± 0,07 <sup>y</sup>	11,91 ± 0,10	65,78 <sup>d</sup> (173/263)	45,29 <sup>d</sup> (173/382)
<b>Tratamentos</b>	<b>N</b>	<b>Cio (dias)**</b>	<b>Ø folicular na IA (mm)</b>	<b>Taxa de Concepção (%)</b>	<b>Taxa de prenhez (%)</b>
CIDR1-d7	112	4,13 ± 0,11	11,58 ± 0,15 <sup>f,g</sup>	55,35 (62/112)	35,43 (62/175)
CIDR3-d7	112	3,39 ± 0,11	11,91 ± 0,15 <sup>f</sup>	58,93 (66/112)	39,76 (66/166)
CIDR1-d9	125	3,17 ± 0,11	11,47 ± 0,14 <sup>g</sup>	65,60 (82/125)	43,39 (82/189)
CIDR3-d9	138	2,63 ± 0,10	12,35 ± 0,14 <sup>e</sup>	65,94 (91/138)	47,15 (91/193)

\*\* Resultados tendo como base o dia da retirada do dispositivo (dia 7 ou dia 9).

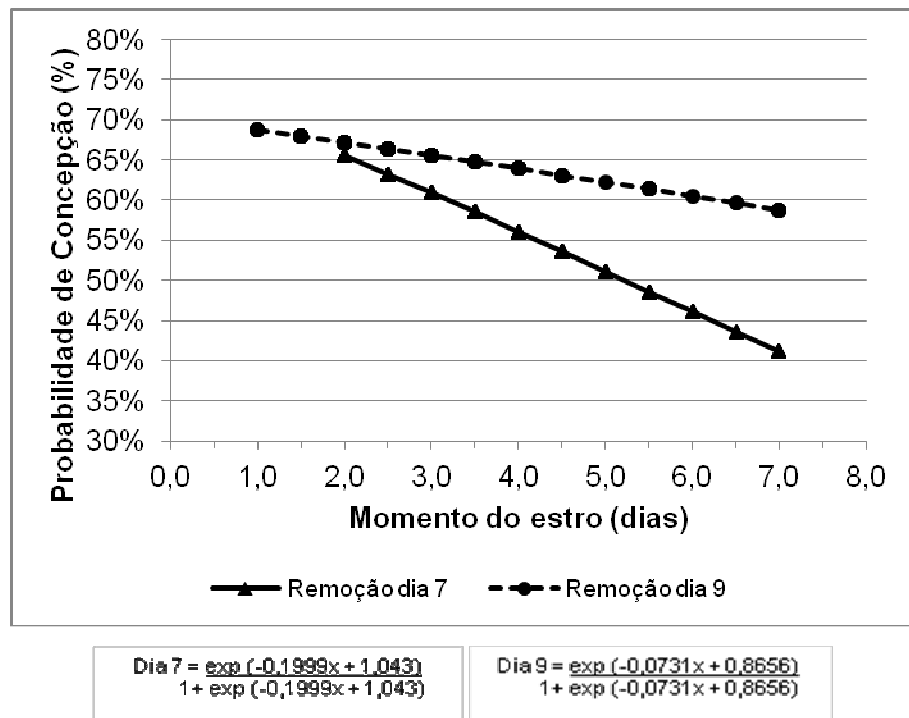
a,b – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,01$

x,y – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,01$

c,d – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,05$

e,f,g – Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,05$

Houve interação ( $p < 0,10$ ) entre o momento do cio e dia da retirada do dispositivo na probabilidade de concepção de novilhas (figura 12, tabela 3).



**Figura 12:** Efeito do momento do estro na probabilidade de concepção em 487 novilhas cíclicas que receberam CIDR por 7 dias ( $n = 224$ ) ou 9 dias ( $n = 263$ ).

**Tabela 3:** Taxa de concepção de acordo com o momento do cio ( $\leq 3,0$  ou  $> 3,0$  dias) de 487 novilhas.

Remoção do CIDR	Taxa de Concepção (%)	
	$\leq 3,0$ dias (média = 2,4)	$> 3,0$ dias (média = 4,6)
<b>Dia 7</b>	66,67 <sup>a</sup> (60/90)	50,75 <sup>b</sup> (68/134)
<b>Dia 9</b>	65,66 <sup>a</sup> (130/198)	66,15 <sup>a</sup> (43/65)

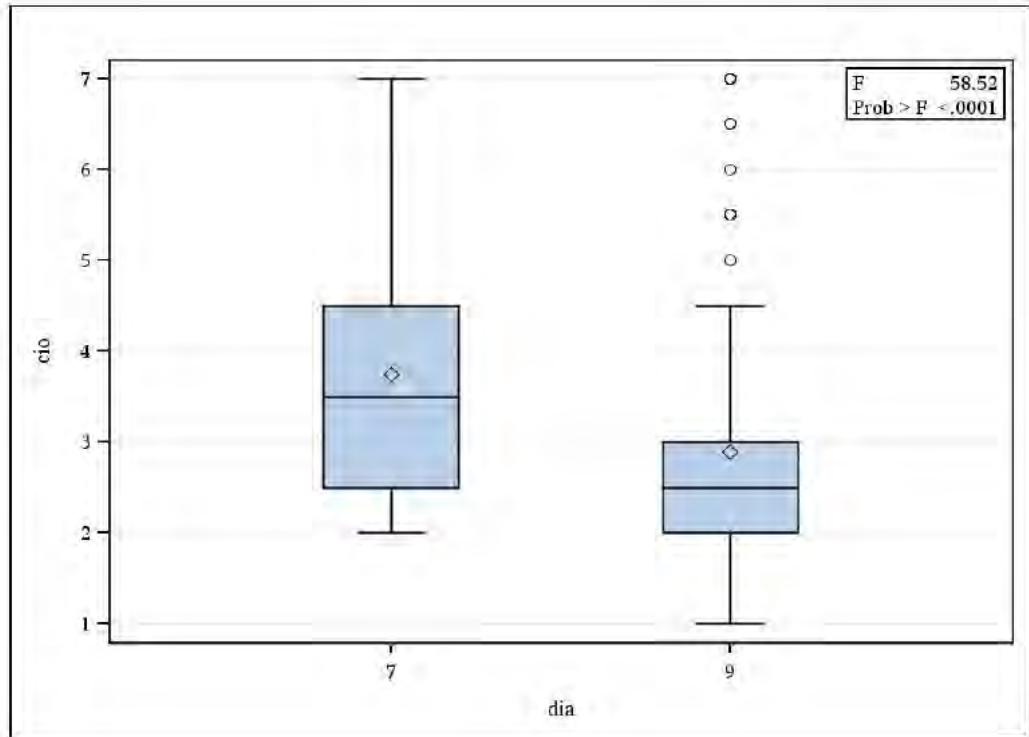
\*\* Resultados tendo como base o dia da retirada do dispositivo (dia 7 ou dia 9).

a,b – Letras distintas diferem estatisticamente;  $P < 0,05$

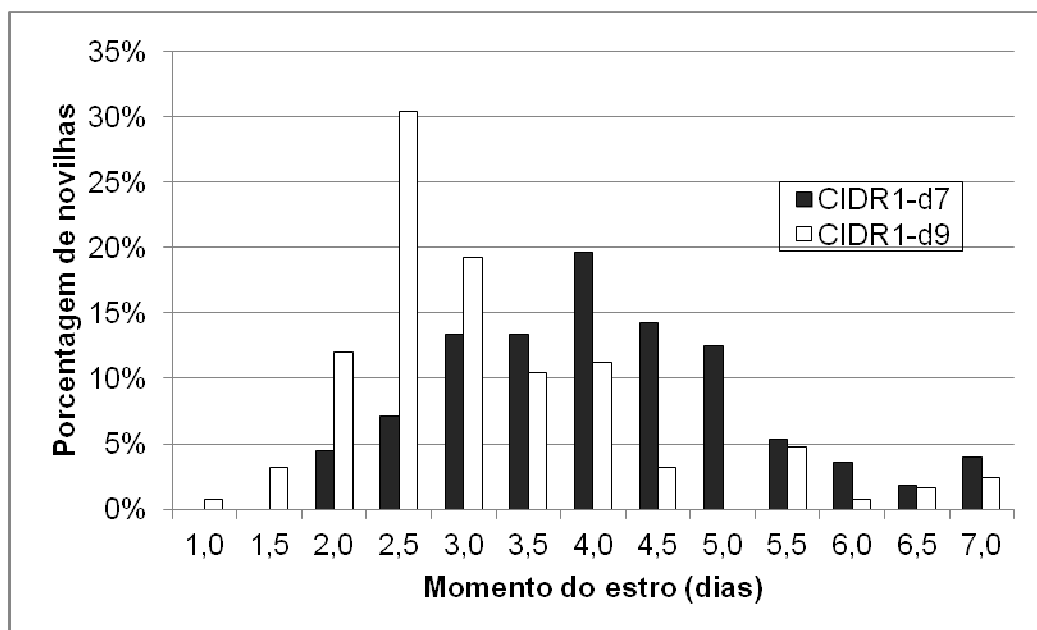
### **Gráficos de distribuição de cio**

O dia da remoção do dispositivo interferiu ( $p < 0,01$ ) na distribuição de cio (figura 13). A análise dos grupos CIDR1-d7 vs CIDR1-d9 ( $F = 37,55$ ;  $p < 0,01$ ) e CIDR3-

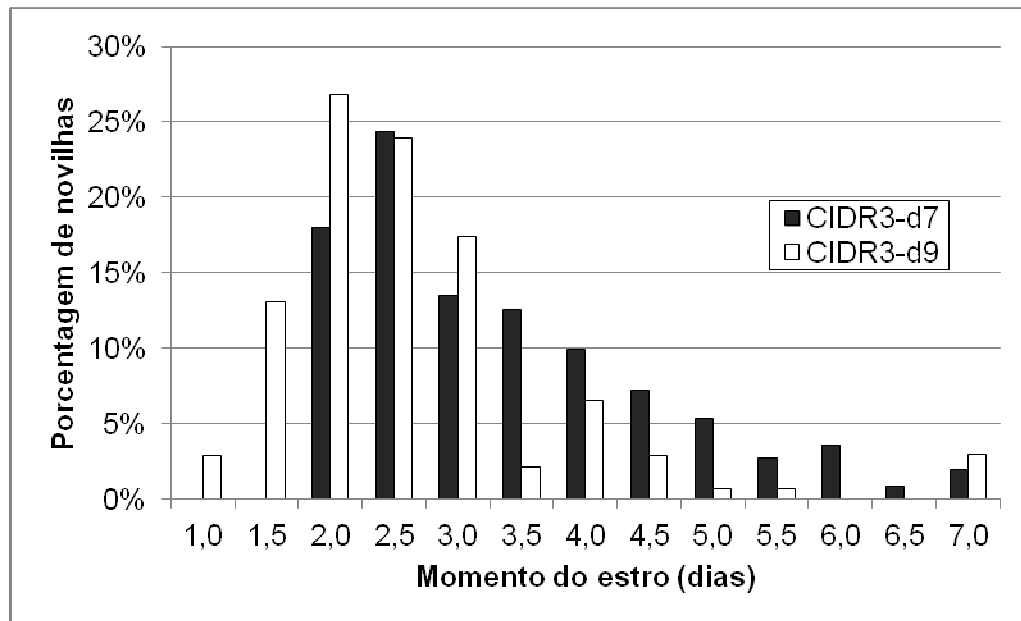
d7 vs CIDR3-d9 ( $F = 23,50$ ;  $p < 0,01$ ) demonstrou que novilhas com dispositivo por 7 dias apresentaram maior dispersão do cio (figuras 14 e 15).



**Figura 13:** Variação da distribuição do cio entre as novilhas que permaneceram com CIDR por 7 (n= 224) ou 9 dias (n= 263).



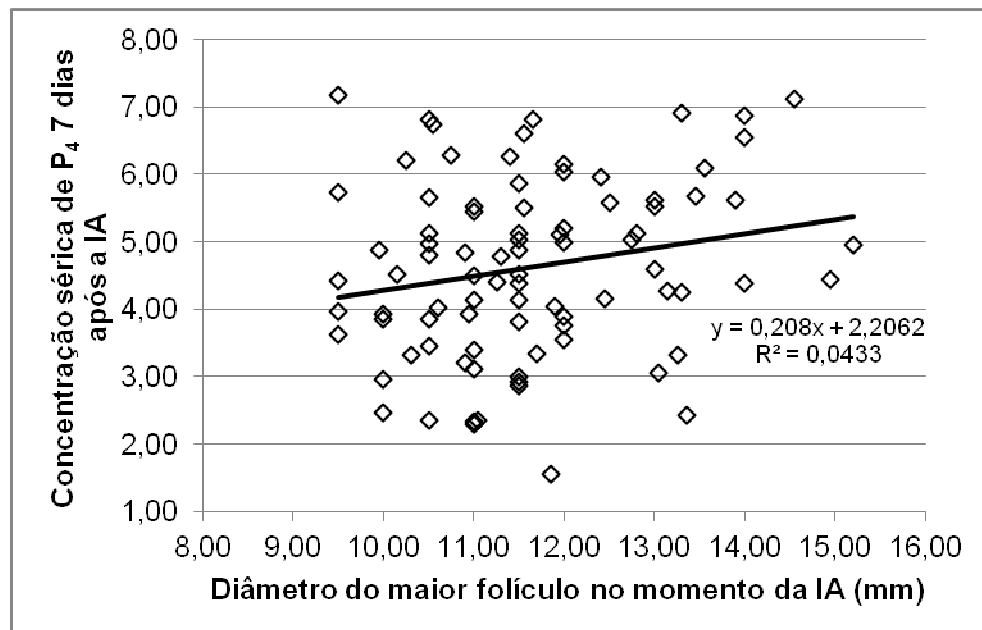
**Figura 14:** Gráfico de distribuição de cio dos grupos CIDR1-d7 (n= 112) e CIDR1-d9 (n= 125).



**Figura 15:** Gráfico de distribuição de cio dos grupos CIDR3-d7 (n= 112) e CIDR3-d9 (n= 138).

### **Concentração sérica de progesterona 7 dias após a IA**

O número de usos do CIDR interferiu ( $p < 0,01$ ) na concentração sérica de  $P_4$  após a IA (CIDR3:  $5,00 \pm 0,22$ ; n= 44 vs CIDR1:  $4,28 \pm 0,17$ ; n= 55). Entretanto, não houve efeito ( $p > 0,10$ ) da concentração de  $P_4$  na taxa de concepção. Houve efeito ( $p < 0,05$ ) do diâmetro folicular no momento da IA na concentração sérica de  $P_4$  (figura 16). O dia da retirada não afetou ( $p > 0,10$ ) a concentração sérica de  $P_4$ .

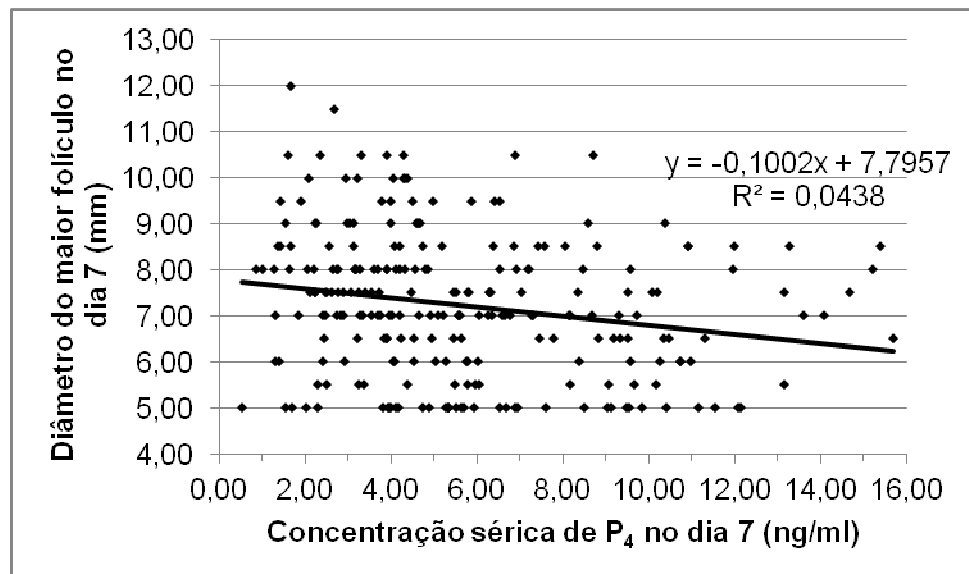


**Figura 16.** Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IA e a concentração de progesterona 7 dias após a IA em novilhas Nelore cíclicas submetidas a detecção de cio (n = 99).

### 3.2. Experimento 2

#### **Concentração sérica de progesterona e diâmetro do maior folículo no dia 7**

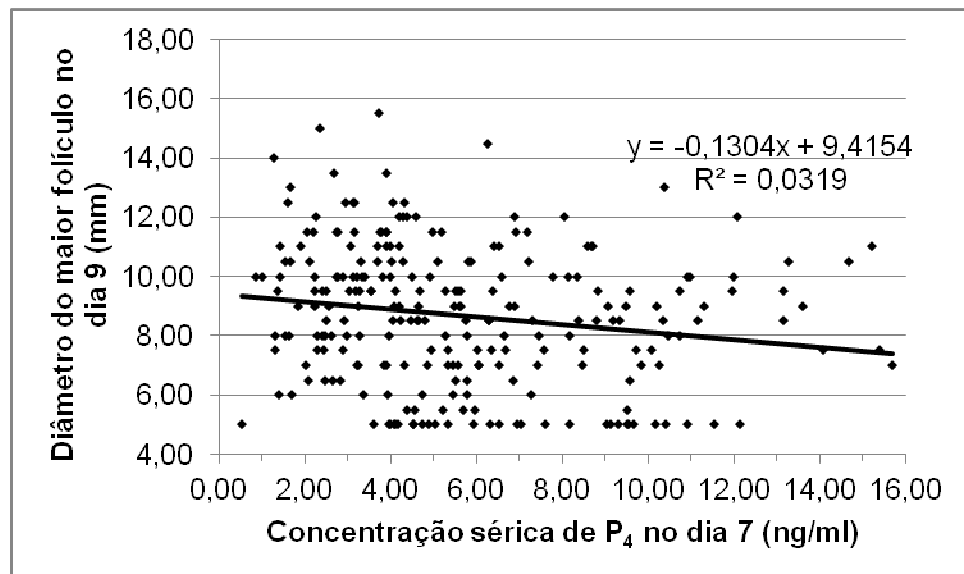
Novilhas que receberam CIDR de 3º uso apresentaram ( $p < 0,01$ ) folículos maiores ( $7,60 \pm 0,13$  mm,  $n = 126$ ) que os animais tratados com dispositivo de 1º uso ( $6,84 \pm 0,13$  mm,  $n = 124$ ). A concentração sérica de P<sub>4</sub> no dia 7 foi afetada ( $p < 0,01$ ) pelo número de usos do CIDR (CIDR1:  $6,61 \pm 0,27$  e CIDR3:  $4,77 \pm 0,27$  ng/ml). Houve efeito ( $p < 0,01$ ) da concentração sérica de P<sub>4</sub> no diâmetro do folículo (figura 17).



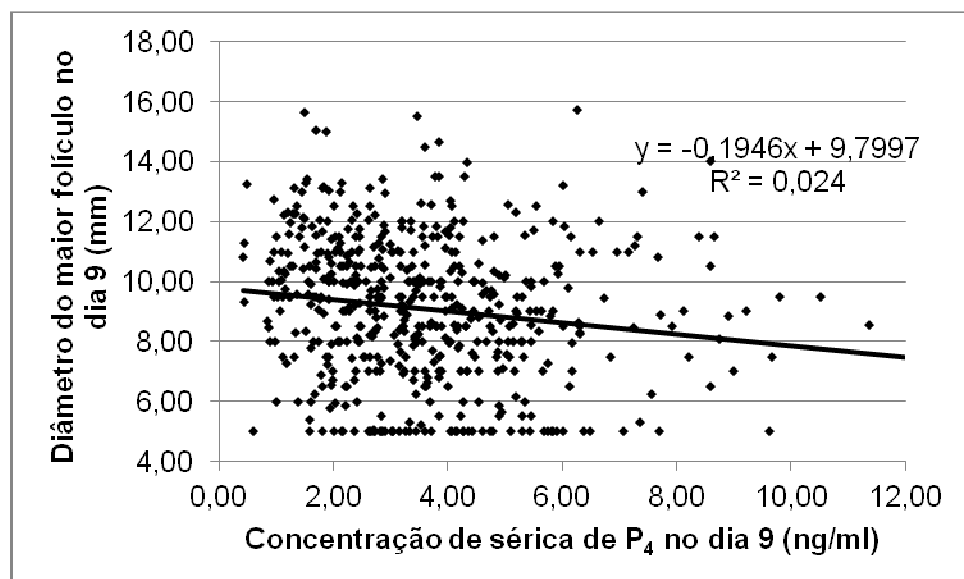
**Figura 17:** Correlação entre a concentração sérica de P<sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 7 (n = 250).

### **Concentração sérica de progesterona e diâmetro do maior do folículo no dia 9**

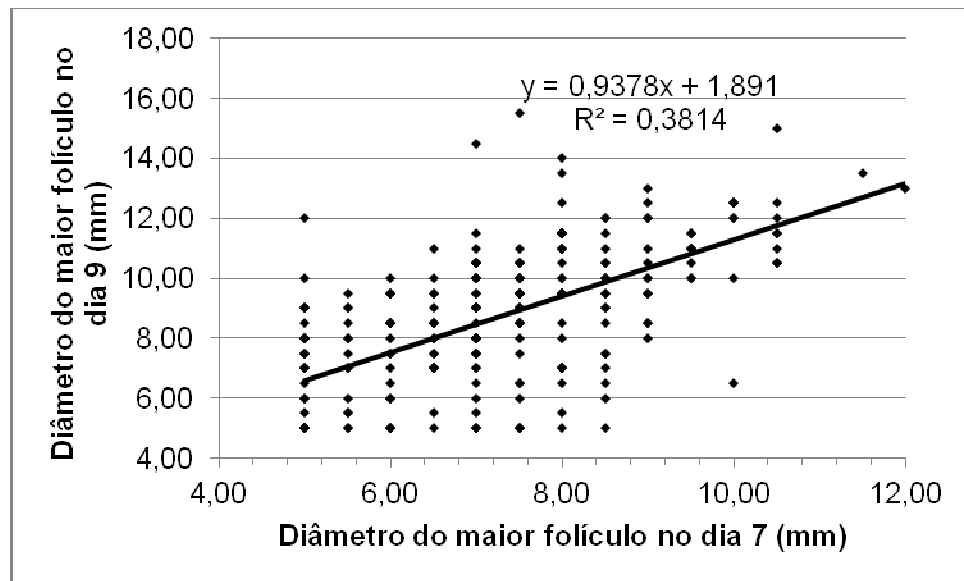
O diâmetro folicular foi maior ( $p < 0,01$ ) nas novilhas com CIDR de 3° uso ( $9,62 \pm 0,40$  mm; n= 270) em comparação ao CIDR de 1° uso ( $8,53 \pm 0,40$  mm; n= 262). Novilhas que tinham CL no dia 7 apresentaram menor diâmetro folicular ( $p < 0,05$ ) no dia 9 (CL:  $8,33 \pm 0,20$  mm; n= 124) em relação às sem CL ( $8,97 \pm 0,20$  mm; n= 126). A concentração sérica de P<sub>4</sub> no dia 9 foi afetada ( $p < 0,01$ ) pelo número de usos do CIDR (CIDR1:  $4,31 \pm 0,11$  vs CIDR3:  $2,86 \pm 0,11$  ng/ml). Houve efeito ( $p < 0,01$ ) da concentração de sérica P<sub>4</sub> do dia 7 e 9 no diâmetro folicular (figuras 18 e 19). O diâmetro folicular do dia 7 foi correlacionado positivamente ( $p < 0,01$ ) com o diâmetro folicular do dia 9 (figura 20).



**Figura 18:** Correlação entre a concentração sérica de P<sub>4</sub> do dia 7 e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 250).



**Figura 19:** Correlação entre a concentração sérica de P<sub>4</sub> e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 532).



**Figura 20:** Correlação entre o diâmetro do maior folículo no dia 7 e o diâmetro do maior folículo no dia 9 (n = 250).

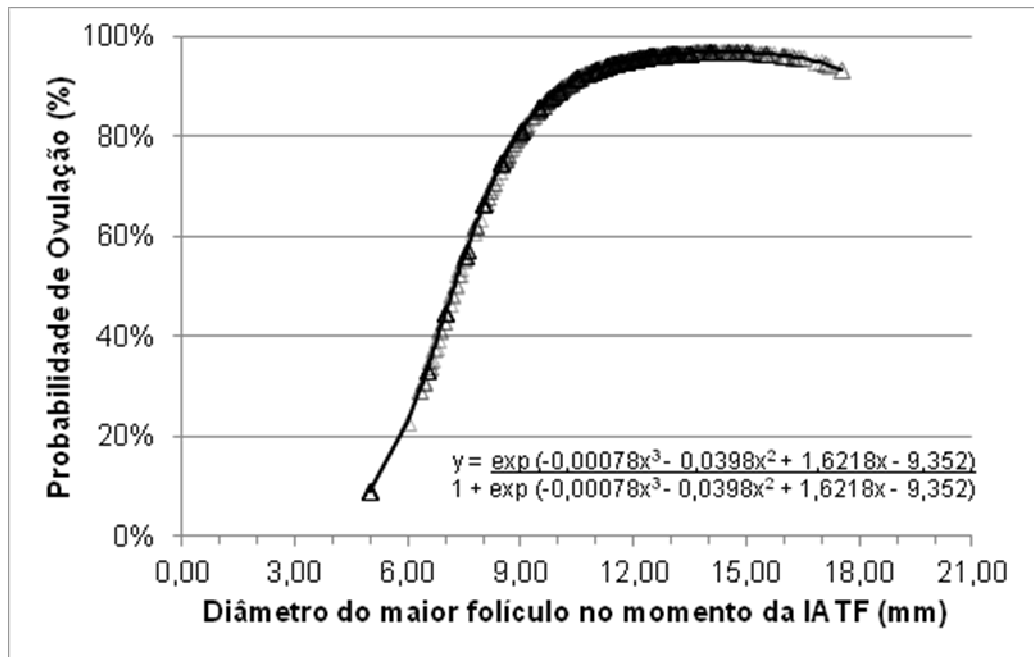
### **Diâmetro do maior folículo no momento da IATF**

A proporção de novilhas ovuladas antecipadamente ( $\emptyset$  fol-IATF  $\leq 6,2$  mm e [ ] de  $P_4$  pós IATF  $\geq 1,0$  ng/ml) retiradas da análise do diâmetro do maior folículo foi maior ( $p < 0,01$ ) nos grupos CIDR1-72h: 13,35% (20/160) e CIDR3-72h: 37,72% (63/168) do que nos demais tratamentos (CIDR1-48h: 7,42% - 10/140; CIDR1-54h: 6,99% - 10/144; CIDR3-48h: 8,41% - 13/158; CIDR3-54h: 6,49% - 10/156). Animais tratados com CIDR de 3° uso apresentaram ( $p < 0,01$ ) folículos maiores ( $11,65 \pm 0,11$  mm; n= 396) comparado ao CIDR de 1° uso ( $11,20 \pm 0,10$  mm; n= 404). Houve interação entre o número de usos do dispositivo e horário da IATF ( $p < 0,05$ ). Essa interação demonstrou que o diâmetro do grupo CIDR3-72h ( $11,20 \pm 0,20$  mm; n= 105) foi menor em relação ao CIDR3-54h ( $11,98 \pm 0,17$  mm; n= 146) e CIDR3-48h ( $11,76 \pm 0,17$  mm; n= 145). O diâmetro do folículo do dia 7 e 9 foi correlacionado positivamente ( $p < 0,01$ ) com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF (d7:  $r = 0,38$  e d9:  $r = 0,58$ ).

### **Taxa de ovulação**

A taxa de ovulação foi influenciada ( $p < 0,05$ ) pelo número de usos do CIDR (CIDR3: 87,98%; 482/548 vs CIDR1: 82,78%; 444/535). Novilhas inseminadas 72 horas após a remoção do dispositivo apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior taxa de ovulação (89,76%;

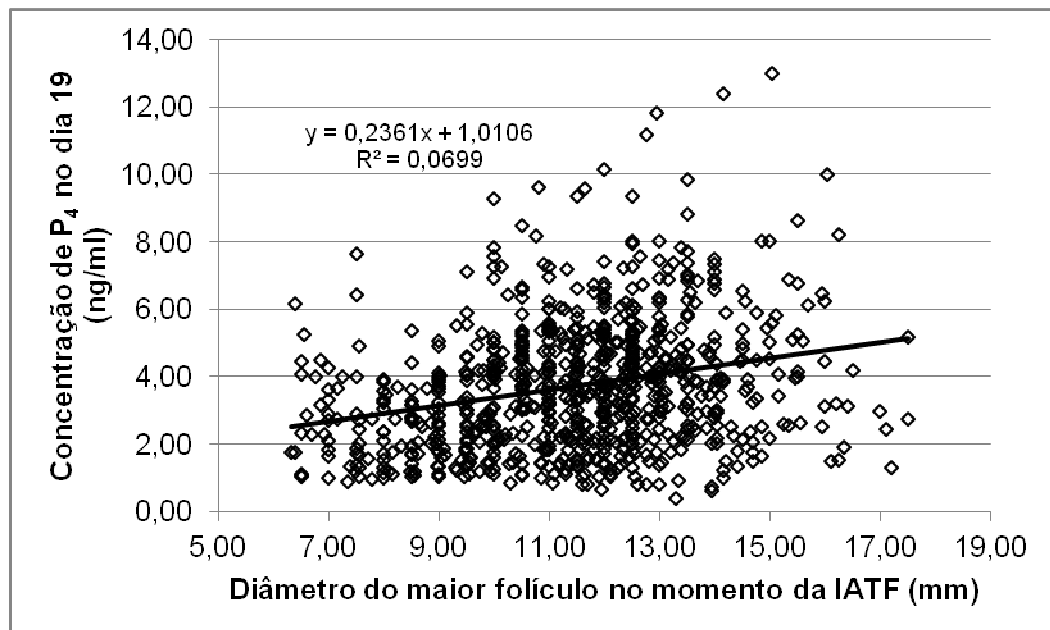
328/365) do que os animais inseminados entre 48h (82,60%; 298/360) e 54h (83,76%; 300/358). A concentração sérica de P<sub>4</sub> no dia 9 não interferiu na taxa de ovulação, porém o diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) influenciou ( $p < 0,01$ ) a probabilidade de ovulação independente do tratamento (figura 21).



**Figura 21:** Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) na probabilidade de ovulação (P<sub>4</sub> ≥ 1,0 ng/ml dez dias após a remoção do dispositivo ) de 957 novilhas Nelore cíclicas .

### Concentração de P<sub>4</sub> no dia 19

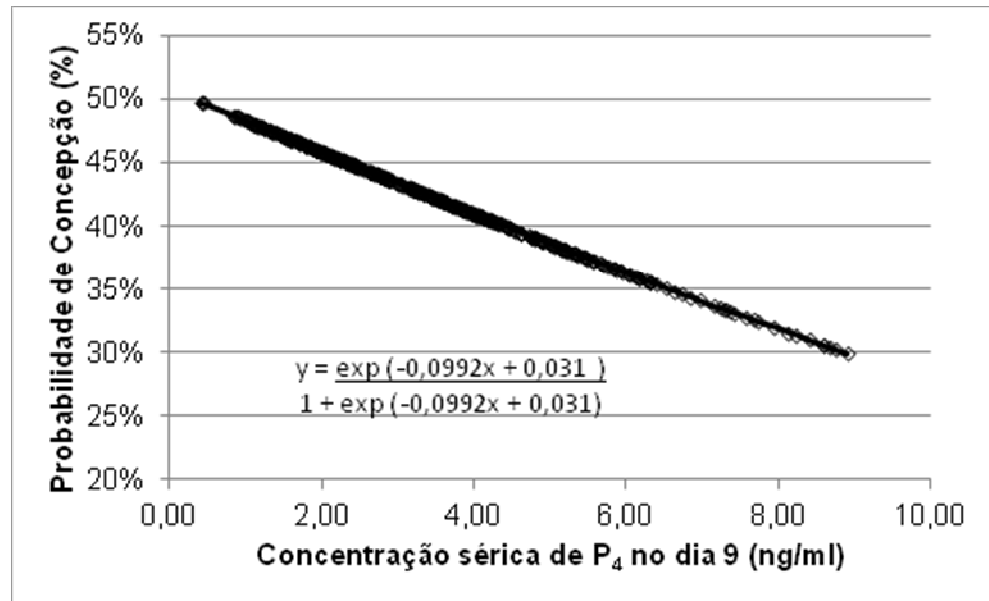
Novilhas que receberam CIDR3 apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior concentração sérica de P<sub>4</sub> que o CIDR1 (CIDR3: 3,97 ± 0,09; n = 482 e CIDR1: 3,62 ± 0,09 ng/ml; n= 444). Houve efeito ( $p < 0,01$ ) do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na concentração de P<sub>4</sub> no dia 19, independente de tratamento (figura 22).



**Figura 22.** Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IATF e a concentração sérica de P<sub>4</sub> dez dias após a remoção do CIDR em 797 novilhas Nelore ovuladas.

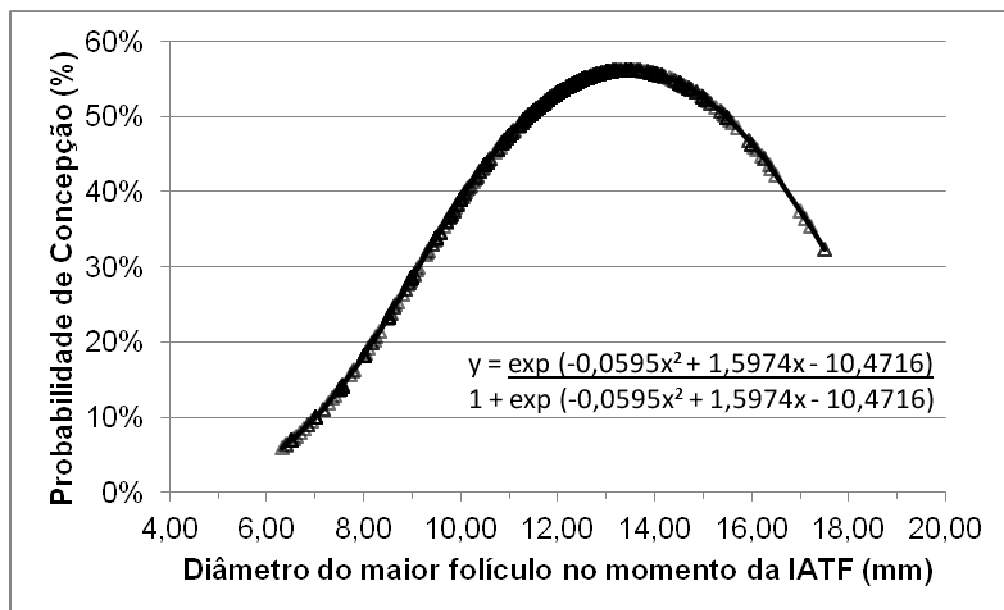
### **Taxa de concepção**

Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do horário da inseminação e número de usos do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> na taxa de concepção das novilhas (tabela 4). A concentração de sérica P<sub>4</sub> no dia 7 não afetou ( $p > 0,10$ ) a concepção, porém a concentração de sérica P<sub>4</sub> no dia 9 tendeu a interferir ( $p < 0,10$ ) na probabilidade de concepção (figura 23). Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do ECC, fazenda, touro e inseminador na taxa de concepção.



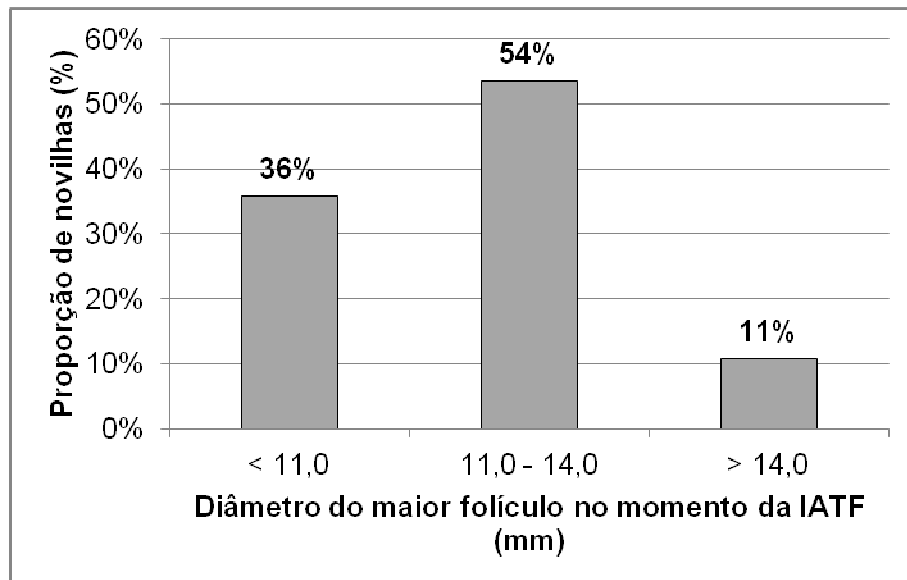
**Figura 23.** Efeito da concentração sérica de progesterona do momento da retirada do dispositivo (dia 9) na probabilidade de concepção de 449 novilhas Nelore cíclicas.

O diâmetro do maior folículo no momento da IATF ( $p < 0,01$ ) e a concentração de progesterona no dia 19 ( $p < 0,05$ ) influenciou a probabilidade de concepção independente do tratamento empregado (figuras 24 e 26).

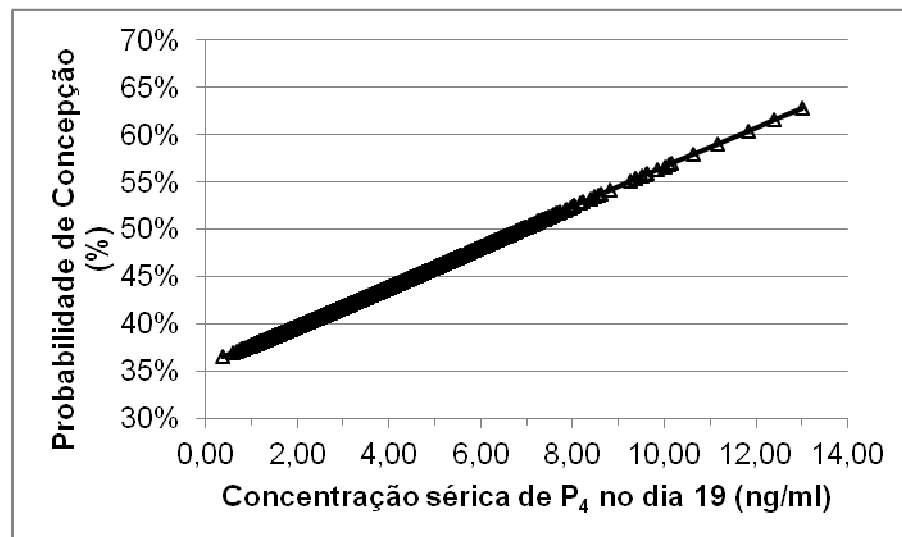


**Figura 24.** Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na probabilidade de concepção de 800 novilhas Nelore ovuladas (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente).

Baseado na probabilidade máxima de concepção (figura 24) foram determinadas três classes representativas de acordo com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF (figura 25).



**Figura 25.** Distribuição das novilhas de acordo com o diâmetro do maior folículo no momento da IATF (mm).



**Figura 26.** Efeito da concentração sérica de progesterona dez dias após a remoção do dispositivo na probabilidade de concepção de 926 novilhas Nelore ovuladas.

### Taxa de prenhez

Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do número de usos do CIDR, horário da inseminação, ECC, fazenda, touro e inseminador na taxa de prenhez (tabela 4).

**Tabela 4.** Taxa de ovulação, concepção e prenhez de 1.083 novilhas Nelore cíclicas que receberam dispositivo intravaginal de progesterona novo ou previamente utilizado por 18 dias, inseminadas 48h, 54h e 72h após a remoção do dispositivo (Fatorial 2x3).

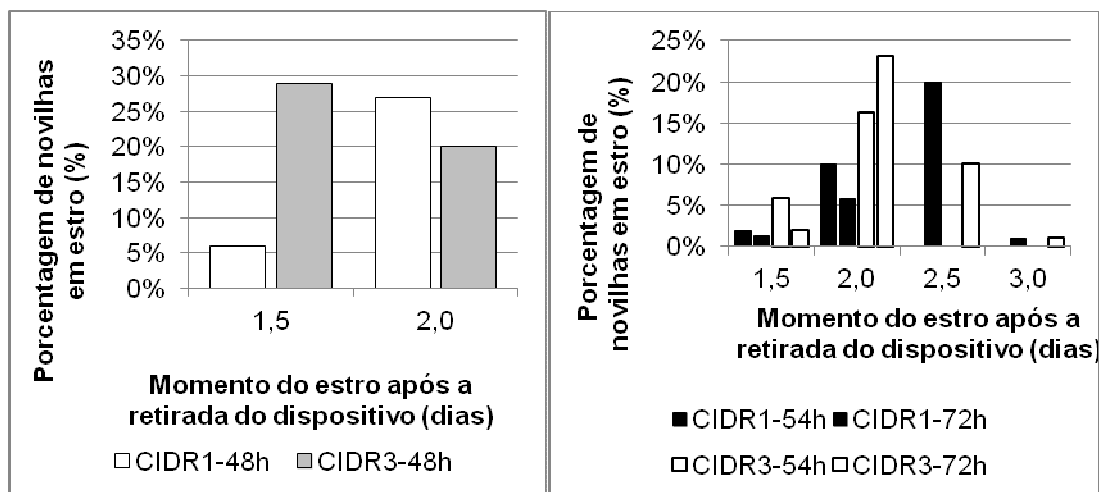
<b>Efeitos Principais</b>	<b>n</b>	<b>Taxa de ovulação (%)</b>	<b>Taxa de Concepção (%)</b>	<b>Taxa de Prenhez (%)</b>
<b>CIDR1</b>	535	82,78 <sup>x</sup> (444/535)	42,50 (187/444)	34,65 (187/535)
<b>CIDR3</b>	548	87,98 <sup>y</sup> (482/548)	45,78 (217/482)	39,36 (217/548)
<b>48h</b>	360	82,60 <sup>b</sup> (298/360)	46,98 (140/298)	38,89 (140/360)
<b>54h</b>	358	83,76 <sup>b</sup> (300/358)	42,33 (127/300)	35,47 (127/358)
<b>72h</b>	365	89,76 <sup>a</sup> (328/365)	41,77 (137/328)	37,53 (137/365)
<b>Tratamentos</b>	<b>n</b>	<b>Taxa de Ovulação (%)</b>	<b>Taxa de Concepção (%)</b>	<b>Taxa de Prenhez (%)</b>
<b>CIDR1-48h</b>	176	79,54 (140/176)	45,00 (63/140)	35,8 (63/176)
<b>CIDR1-54h</b>	178	80,9 (144/178)	40,28 (58/144)	32,58 (58/178)
<b>CIDR1-72h</b>	181	88,4 (160/181)	41,25 (66/160)	36,46 (66/181)
<b>CIDR3-48h</b>	184	85,87 (158/184)	48,73 (77/158)	41,85 (77/184)
<b>CIDR3-54h</b>	180	86,67 (156/180)	44,23 (69/156)	38,33 (69/180)
<b>CIDR3-72h</b>	184	91,3 (168/184)	42,26 (71/168)	38,59 (71/184)

x,y Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,05$ ;

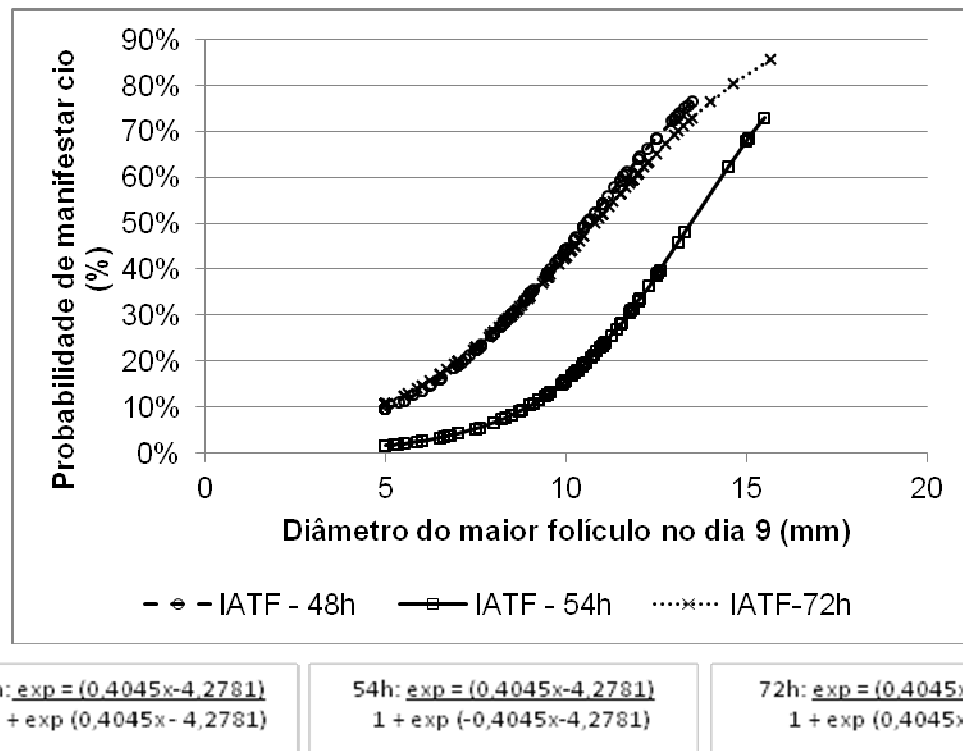
a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,05$ ;

### **Manifestação de cio**

O número de prévias utilizações do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> e o horário da IATF interferiram ( $p < 0,01$ ) na taxa de detecção de cio. Maior proporção de novilhas que receberam CIDR de 3<sup>o</sup> uso foram detectadas em cio (CIDR3: 35,52%; 166/466 e CIDR1: 24,46%; 111/454). O número de novilhas em estro 72 horas após a remoção do dispositivo foi superior ao grupo 54 horas (72h: 31,99%; 99/309 vs 54 h: 17,07%; 52/304). A percentagem de novilhas detectadas em cio que receberam ECP no dia 9 foi superior (40,92%; 126/307) aos demais grupos. A figura 27 ilustra a distribuição de estro de acordo com os grupos. Houve efeito ( $p < 0,01$ ) do diâmetro do folículo no dia 9 na probabilidade de detecção de estro de acordo com o momento da IATF (figura 28).



**Figura 27:** Distribuição do estro das novilhas de acordo com o tratamento (CIDR1-48h; n= 150, CIDR1-54h; n= 151, CIDR1-72h; n= 153, CIDR3-48h; n= 157; CIDR3-54h; n= 153, CIDR3-72h; n=156).



**Figura 28:** Efeito do diâmetro do maior no momento da retirada do dispositivo (dia 9) na probabilidade de manifestar cio de acordo com momento da inseminação (IATF - 48h, n= 152; IATF – 54h, n= 148; IATF – 72h; n=148).

### Cio x Taxa de concepção

Houve tendência ( $p < 0,10$ ) do cio influenciar a taxa de concepção de novilhas que receberam GnRH (cio: 46,70%; 69/151 vs não cio: 38,39%; 144/374). O intervalo entre a detecção de cio e a inseminação não interferiu ( $p > 0,10$ ) na taxa de concepção (0-6h: 47,07%; 20/43, 12-18h: 52,08%; 30/58; 24-36h: 40,64%; 19/50). Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do diâmetro folicular no momento da inseminação na taxa de concepção, entretanto novilhas inseminadas após 18 h da detecção de cio apresentaram ( $p < 0,01$ ) diâmetro folicular menor (24-36h:  $6,16 \pm 0,43$  mm; n= 50) comparada as inseminadas entre 0 e 18 h (0 – 6h:  $12,43 \pm 0,46$ ; n= 43 e 12 - 18h:  $11,05 \pm 0,40$  mm; n= 58).

A taxa de concepção dos animais que receberam ECP e manifestaram cio foi superior ( $p < 0,01$ ) aos que não manifestaram cio (cio: 60,39%; 75/126 vs não cio: 37,31%; 46/125). Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do diâmetro folicular, na taxa de concepção das novilhas detectadas em cio que receberam ECP. Novilhas detectadas em estro que receberam ECP apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior diâmetro folicular no

momento da IATF ( $11,45 \pm 0,23$  mm) do que as não observadas em cio ( $10,29 \pm 0,23$  mm).

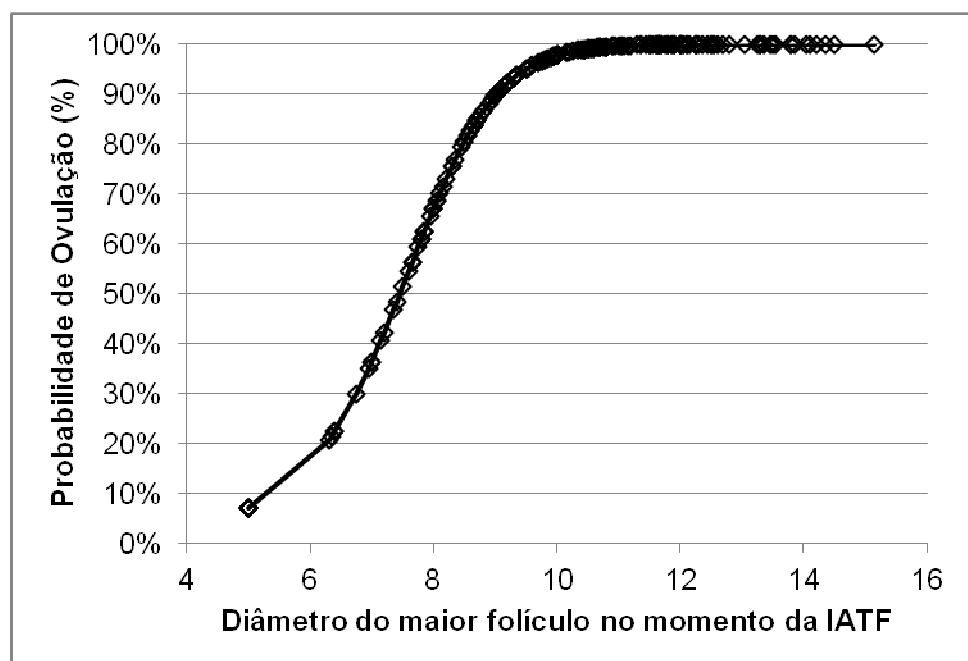
### 3.3. Experimento 3:

#### Diâmetro do maior folículo no momento da IATF

O diâmetro do maior folículo no momento da IATF não diferiu ( $p > 0,10$ ) entre os tratamentos (Grupo1:  $10,65 \pm 0,22$ ;  $n = 63$ , Grupo2:  $10,49 \pm 0,21$ ;  $n = 72$ , Grupo3:  $10,45 \pm 0,22$ ;  $n = 62$ ).

#### Taxa de ovulação

Novilhas que receberam 200 UI de eCG no dia 9, apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior taxa de taxa de ovulação (Grupo 2: 94,68%; 153/162) comparado aos demais grupos (Grupo1: 85,36%; 129/151 e Grupo3: 80,58%; 130/161). Independentemente do tratamento, houve efeito ( $p < 0,01$ ) do diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) na probabilidade de ovulação (figura 29).

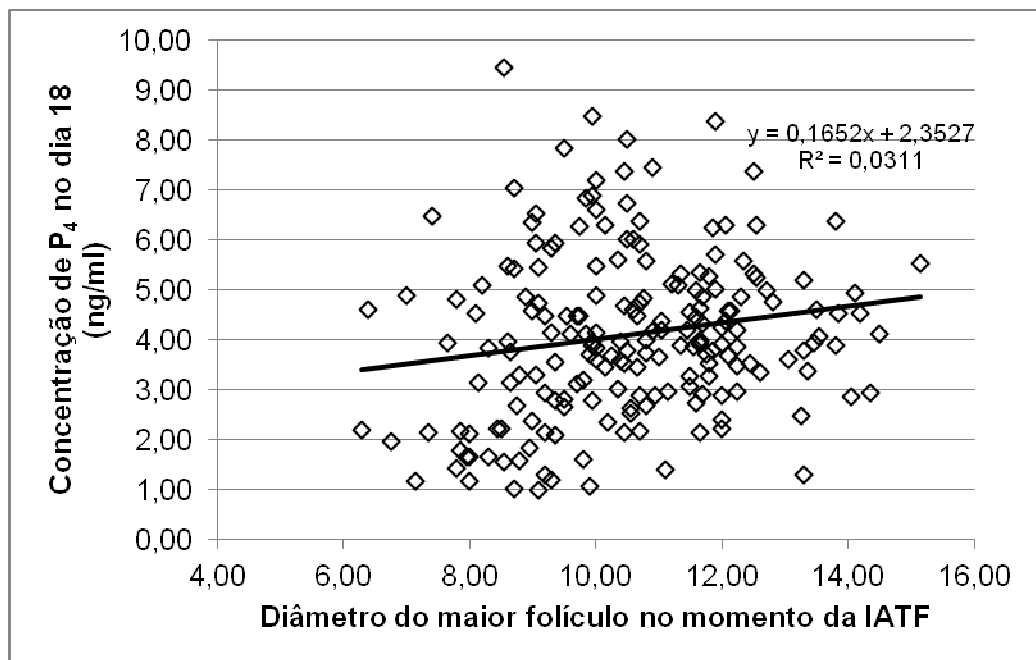


**Figura 29:** Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) na probabilidade de ovulação

( $P_4 \geq 1,0$  ng/ml nove dias após a remoção do dispositivo) de 230 novilhas Nelore cíclicas.

### **Concentração de $P_4$ no dia 18**

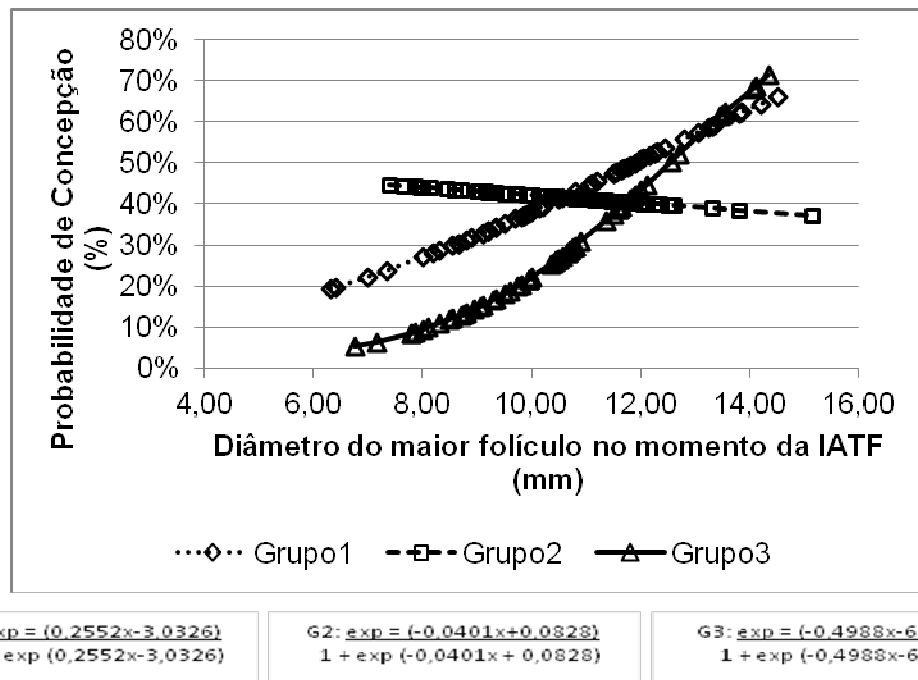
Novilhas que receberam 200 UI de eCG no dia 9, apresentaram ( $p < 0,01$ ) maior concentração sérica de  $P_4$  que os demais grupos (Grupo 1:  $3,84 \pm 0,15$ ;  $n = 129$ , Grupo 2:  $4,47 \pm 0,14$ ;  $n = 153$ , Grupo 3:  $3,77 \pm 0,15$  ng/ml;  $n = 130$ ). Houve efeito ( $p < 0,05$ ) do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na concentração de  $P_4$  no dia 18, independentemente de tratamento (figura 30).



**Figura 30.** Correlação entre o diâmetro do maior folículo no momento da IATF e a concentração sérica de progesterona nove dias após a remoção do CIDR em 197 novilhas Nelore ovuladas.

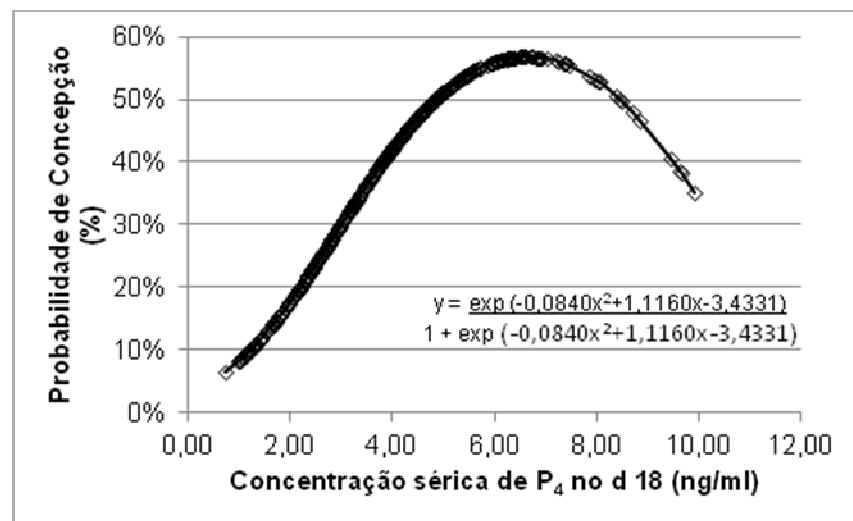
### **Taxa de concepção**

Apesar da diferença numérica (tabela 4), não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do tratamento na taxa de concepção. Houve tendência ( $p < 0,10$ ) de interação entre o tratamento e diâmetro do maior folículo na probabilidade de concepção (figura 31).



**Figura 31:** Efeito do diâmetro do maior folículo no momento da IATF na probabilidade de concepção de 197 novilhas Nelore ovuladas (desconsiderando novilhas ovuladas antecipadamente) sincronizadas com CIDR de 1º uso (Grupo 1: 1mg de BE, Grupo 2: 200 UI de eCG e Grupo 3: CIDR por 10 dias).

A concentração de progesterona no dia 18 ( $p < 0,01$ ) interferiu na probabilidade de concepção (figuras 32), independentemente do tratamento. Não houve efeito ( $p > 0,10$ ) do ECC, fazenda e inseminador na taxa de concepção.



**Figura 32.** Efeito da concentração sérica de progesterona nove dias após a remoção do dispositivo na probabilidade de concepção de 412 novilhas Nelore ovuladas.

### Taxa de prenhez

Houve tendência ( $p < 0,10$ ) do tratamento influenciar a taxa de prenhez (tabela 5). Não houve efeito do ECC, fazenda e inseminador na taxa de prenhez.

**Tabela 5.** Taxa de ovulação, concepção e prenhez de 474 novilhas Nelore cíclicas que receberam os tratamentos: 1 ml de BE (Grupo1), 200 UI de eCG (Grupo 2) ou CIDR10 (Grupo 3).

Efeitos	N	Taxa de Ovulação (%)	Taxa de Concepção (%)	Taxa de Prenhez (%)
<b>Grupo 1</b>	151	85,36 <sup>b</sup>	41,08	35,10 <sup>xy</sup>
		(129/151)	(53/129)	(53/151)
<b>Grupo 2</b>	162	94,68 <sup>a</sup>	40,52	38,27 <sup>x</sup>
		(153/162)	(62/153)	(62/162)
<b>Grupo 3</b>	161	80,58 <sup>b</sup>	33,08	26,71 <sup>y</sup>
		(130/161)	(43/130)	(43/161)

a,b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,01$ ;

x, y Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente;  $P < 0,05$ ;

## 4. DISCUSSÃO

Nesses estudos, maiores concentrações séricas de  $P_4$  diminuíram o diâmetro do folículo em todos os momentos avaliados. Tendo em vista que as concentrações séricas de  $P_4$  não alteram diretamente o perfil de liberação de FSH (GIBBONS et al., 1999 e ADAMS et al., 1992), responsável pelo desenvolvimento folicular antes da divergência (GINTHER et al., 1996), e que mudanças nos níveis FSH foram observadas apenas em decorrência do tempo de dominância do folículo (ADAMS et al., 1992 e PRICE e WEBB., 1988). Pode-se concluir que, o provável mecanismo pelo qual a concentração sérica de  $P_4$  afetou negativamente o desenvolvimento folicular nos dias 7 (figura 4 e 17) e 9 (figuras 6 e 19) esteve relacionado à redução da pulsatilidade de LH (BERGFELD et al., 1996, KOJIMA et al., 2003 e PFEIFER et al. 2009), que interferem diretamente no crescimento e manutenção do folículo dominante (TAFT et al., 1996 e PFEIFER et al., 2009). É provável que por volta dos dias 5 e 6 do protocolo de sincronização já exista um folículo dominante dependente de LH (5,4 a 6,2 mm SARTORELLI et al., 2005, CASTILHO et al., 2006 e GIMENES et al., 2008),

considerando que o momento da emergência de uma nova onda sincronizada ocorre entre 3,1 e 3,5 dias (BÓ et al. 2003, CARVALHO et al., 2008 e BASTOS et al. 2011) e a divergência cerca 1,6 e 1,8 dias após a emergência (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006 e GIMENES et al., 2008). Os níveis circulantes de progesterona não interferem na emergência e divergência folicular (GIBBONS et al., 1999 e LOPES et al., 2005).

Animais que ovulam folículos menores apresentam menores concentrações de  $P_4$  no diestro subsequente (VASCONCELOS et al., 2001 e PERES et al., 2009) e existem correlações positivas entre o diâmetro do folículo ovulatório e a taxa de prenhez (PERRY et al., 2005 e 2007, DIAS et al., 2009 e PERES et al., 2009) e entre concentração de  $P_4$  no diestro e a taxa de prenhez (VASCONCELOS et al., 2001 e PERES et al., 2009). Em fêmeas cíclicas, estratégias como o emprego de dispositivos intravaginais de  $P_4$  previamente utilizado e o momento da aplicação da  $PGF2\alpha$ , permitem reduzir as concentrações séricas de progesterona e aumentar o diâmetro folicular incrementando assim a fertilidade.

Utt et al., (2003), Carvalho et al. (2008) e Pfeifer et al. (2009) verificaram que a administração de  $PGF2\alpha$  no início do protocolo de sincronização em animais pré-sincronizados, resultou em maior diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do implante de progesterona. Peres et al. (2007) observaram que aplicação de  $PGF2\alpha$  no dia da inserção do dispositivo, antecipou o momento do estro ( $PGF2\alpha$ :  $72,4 \pm 2,3$  h vs sem  $PGF2\alpha$ :  $80,7 \pm 2,3$ h) em novilhas Nelore púberes que permaneceram com CIDR por 7 dias. De maneira similar, os resultados da figura 8 demonstram que novilhas com menor concentração de  $P_4$  no dia 7 foram detectadas em cio mais cedo.

Embora os níveis de progesterona já afetem o desenvolvimento folicular no dia 7 e a aplicação de duas doses de  $PGF2\alpha$  (início e fim do protocolo de sincronização), constitua uma alternativa eficiente em diminuir as concentração séricas de  $P_4$  de novilhas pré-sincronizadas (CARVALHO et al., 2008), a sensibilidade do CL à prostaglandina e seus análogos é baixa ou nula em animais que se encontram entre os dias 1 a 5 do ciclo estral (FERNANDES et al., 2007), o qual constitui aproximadamente 24% das novilhas que entram em protocolo em dia aleatório do ciclo estral. Essas novilhas apresentam altos níveis de  $P_4$  no fim do protocolo e conseqüentemente redução do desenvolvimento folicular (figuras 6 e 19).

Estratégias que visam reduzir a concentração circulante de progesterona durante os estágios finais dos protocolos de sincronização proporcionam efeitos similares ao observados por Carvalho et al. (2008), promovendo a luteólise em todos

animais com CL. Dias et al. (2009), Peres et al. (2009) e Meneghetti et al. (2009) verificaram que a administração da PGF2 $\alpha$  dois dias antes da remoção do implante de progesterona (dia9), foi eficiente em aumentar o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e a taxa de concepção.

Apesar de eficaz, este método atua apenas na fase final do crescimento folicular, de maneira que os efeitos da progesterona inicial podem ser notados no diâmetro folicular do dia 9 (experimento 1 e 2). Mesmo após a aplicação da PGF2 $\alpha$ , as concentrações de P<sub>4</sub> proveniente do dispositivo intravaginal ainda foram suficientes para interferir no desenvolvimento folicular final (tabela 1, figuras 6 e 19) e momento do estro (figura 9), de maneira que maiores efeitos foram notados em novilhas que permaneceram com CIDR de primeiro uso durante nove dias (experimento 1 e 2). Mantovani et al. (2010) observaram que a aplicação de prostaglandina no dia 5 de um protocolo de 8 dias, promoveu redução do níveis de progesterona e aumento do desenvolvimento folicular em novilhas cruzadas púberes pré-sincronizadas. Dessa forma, deve-se considerar a aplicação da PGF2 $\alpha$  no dia 6 do protocolo de sincronização visando o maior desenvolvimento folicular em novilhas púberes.

Todas essas estratégias têm como objetivo maximizar o aporte gonadotrópico durante o desenvolvimento folicular, sendo assim a retirada antecipada do dispositivo permitiu maior crescimento do folículo entre os dias 7 e 9 (tabela1). Entretanto, resultou em maior intervalo e dispersão do cio (figura 13), inviabilizando a escolha de um momento adequado para IATF em novilhas *Bos indicus*.

O diâmetro e a idade do folículo dominante (FD) no dia da retirada do dispositivo esteve diretamente correlacionado com o dia do estro (UTT et al., 2003), por isso novilhas que permaneceram com CIDR por 7 dias (experimento 1) apresentaram maior intervalo e variabilidade entre a retirada do dispositivo e o estro. Bridges et. al. (1999) verificaram que vacas *Bos taurus* sincronizadas com 2 mg de BE que permaneceram com dispositivo por 5 dias apresentaram menor diâmetro folicular no dia da IATF (9,8 mm) do que o grupo que permaneceu com dispositivo por 7 dias (11,8 mm). Em experimento subsequente com vacas Holandesas, Cavalieri et. al (2004) detectaram aumento da proporção de folículos <10 mm no dia da retirada do dispositivo quando empregaram CIDR por 5 dias comparados com tratamento por 7, 8 e 9 dias.

De acordo com Austin et al. (1994), a duração da dominância do folículo pré-ovulatório afeta o tempo e a variabilidade entre o intervalo da retirada do dispositivo e o estro. Os autores observaram atraso de 5 a 10 horas no início do estro nas novilhas

com FD mais novo (2 a 4 dias) em relação aos animais com FD mais velho (6 a 8 dias). Abreu et al. (2011a) também verificaram que vacas com folículos mais novos apresentaram maior intervalo para o estro ( $79 \pm 0,7h$ ) do que as com folículos mais velhos ( $56 \pm 1,7h$ ). O mesmo foi constatado por Abreu et al. (2011b) em novilhas ( $53,6 \pm 2,2 h$  vs  $78,5 \pm 1,4$  horas).

Além da maior dispersão do cio, houve queda na taxa de concepção das novilhas que permaneceram com CIDR por 7 dias, contrariando nossa hipótese inicial e os dados da literatura que indicam que a manipulação do tempo de dominância do folículo dominante não afeta a fertilidade em animais de corte (AHMAD et al., 1997, BRIDGES et al., 2008, ABREU et al., 2011a,b e DIAS et al., 2011).

As causas desse resultado e, principalmente do efeito do momento do estro na taxa de concepção das novilhas que permaneceram com CIDR por 7 dias (figura 12) não são claras, porém o aumento do tempo de dominância folicular após a aplicação da  $PGF2\alpha$  resultou em estro mais fértil nos animais detectados em estro com mais de 3 dias (tabela 3). Claro Junior et al. (2010), trabalhando com indução de puberdade, observaram que a taxa de detecção de cio (taxa de indução) entre as novilhas tratadas por doze dias com dispositivo intravaginal novo ( $101/237 = 42,6\%$ ) ou previamente utilizado por 27 dias ( $94/237 = 39,3\%$ ) não diferiu. Porém, a taxa de concepção das novilhas que receberam CIDR usado foi superior ( $44/94 = 46,8\%$  vs  $34/101 = 33,7\%$ ). Os autores atribuíram esse resultado à melhora do ambiente uterino durante o período pré-ovulatório, já que as novilhas que permaneceram com CIDR previamente utilizado por 27 dias, apresentaram maior diâmetro folicular e escore uterino no dia da remoção do dispositivo. Diversos estudos (MURRAY, 1992, JOHNSON et al., 1997 e GEISERT et al., 1988) demonstraram a importância dos níveis de estradiol pré-ovulatório no preparo uterino para o desenvolvimento inicial do concepto.

De maneira similar, novilhas que permaneceram com CIDR por 9 dias apresentaram maior diâmetro folicular no dia da remoção do dispositivo (tabela 1). Portanto, é possível sugerir que o período de exposição uterina ao estradiol durante o período pré-ovulatório pode ter melhorado o ambiente uterino e a fertilidade dos animais tratados com CIDR por 9 dias. Esse aumento do tempo de dominância foi principalmente importante entre as novilhas que apresentaram menor diâmetro folicular no dia da retirada do dispositivo (figuras 10 e 11) e, por isso, maior intervalo para cio. Dessa forma, a queda de fertilidade nas novilhas tratadas com CIDR por 7 dias (tabela 3), pode ter ocorrido como consequência da redução do tempo de dominância folicular.

Apesar da diferença na taxa de concepção, o diâmetro folicular no momento da IA e a concentração sérica de  $P_4$  pós IA não afetaram a fertilidade de novilhas detectadas em estro (experimento1). Resultados similares foram obtidos por Perry et al. (2005) após a inseminação de vacas em estro. Os autores concluíram que estes eram folículos maduros e por isso não interferiram na fertilidade. Embora o diâmetro folicular não tenha sido importante entre animais que foram submetidos a IA convencional, o mesmo parâmetro alterou de maneira significativa a taxa de concepção na IATF (figuras 24 e 31). Novilhas com folículos entre 11,0 e 14,0 mm tiveram maior probabilidade de concepção (figura 24), contudo, 36% das novilhas apresentaram folículos menores que 11,0 mm (imaturos) constituindo um agravante nessa categoria animal. Vasconcelos et al. (2001) e Perry et al. (2005 e 2007) observaram que a indução da ovulação quando o folículo não está fisiologicamente maduro tem impacto negativo nas taxas de prenhez de animais submetidos a IATF.

Mussard et al. (2007) e Bridges et al. (2008 e 2010) sugerem que a duração do proestro é mais importante do que o diâmetro do folículo ovulatório na fertilidade de animais submetidos à inseminação. Segundo os autores, o aumento da duração do proestro permite maior aporte gonadotrópico para o folículo ovulatório e níveis elevados de estradiol antes da ovulação. Entretanto nesse estudo, o atraso do momento da inseminação (experimento 2), não incrementou a taxa de concepção/prenhez dos animais inseminados 72 horas após a remoção do dispositivo, demonstrando assim que a estratégia não foi eficiente em melhorar o protocolo de sincronização. Portanto, a extensão da duração do proestro diante de uma grande proporção de folículos imaturos (figura 25), foi incapaz de melhorar os resultados comparados aos demais tratamentos.

Mesmo que o atraso do momento da inseminação não tenha sido suficiente para aumentar o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF, a estratégia permitiu maior expressão de estro antes da IATF (figura 27), característica que foi correlacionada com maior taxa de prenhez em vacas e novilhas (PERES et al. 2009 e SÁ FILHO et al. (2010a e 2011). Contudo, este fator somente tendeu a influenciar a taxa de concepção de novilhas inseminadas em tempo fixo que receberam GnRH. Dorsey et al. (2011) verificaram uma variação na concepção de novilhas inseminadas em momentos diferentes após o início do estro. Segundo os autores, melhores resultados foram obtidos quando a inseminação ocorreu entre 4 e 24 horas após o início do cio (63,7%) ao invés de 0-4 h (48,1%) e > 24h (55,9%). Nesse estudo, houve uma diferença numérica na taxa de concepção quando a inseminação foi realizada

antecipadamente 0-6h (47,07%) ou tardiamente 24-36h (40,64%) comparada ao intervalo 12 – 18h (52,08%) considerado ideal (FIELDS et. al 1975). Roelofs et al. (2006), verificaram que em vacas de leite, o momento ideal para se obter taxas de fertilização satisfatórias foi em torno de 24 a 12h antes da ovulação. Entre 16 e 12h antes da ovulação os autores verificaram 89% embriões de alta qualidade.

Embora os valores apresentados não tenham sido significativos, é possível afirmar que as variações no momento da inseminação comprometeram a fertilidade das novilhas que expressaram estro e que não foram inseminadas entre 12 e 18h. Dessa forma, mesmo que mais novilhas tenham expressado estro 72 horas após a retirada do dispositivo, melhores taxas de concepção não foram notadas nesse horário. Ainda que a taxa de detecção de cio tenha sido superior (54h: 17,07% vs 72h: 31,99%), pode-se considerar que expressão de cio foi baixa, contribuindo para ausência de efeitos detectados na taxa de concepção. As baixas taxas de detecção de cio também são reflexo da proporção de novilhas com folículos pequenos, já que o diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo interferiu na probabilidade de expressão de cio (figura 28).

Além da maior expressão de cio, a inseminação 72 horas após a remoção do dispositivo resultou em aumento da taxa de ovulação, que ocorreu como consequência da maior proporção de novilhas ovuladas antecipadamente (CIDR1-72h: 13,35%; 20/160 e CIDR3-72h: 37,72%, 63/168), prejudicando a fertilidade desse grupo.

Uma alternativa que permite aumentar as concentrações pré-ovulatórias de estradiol, sem a necessidade de alterar o momento da inseminação, é o emprego de E<sub>2</sub> exógeno como estímulo ovulatório. De acordo com Cerri et al. (2004) e Sá Filho et al. (2011), a administração de ECP aumentou a expressão de cio e melhorou a taxa de prenhez dos animais. Similarmente, novilhas que receberam 0,5 mg de ECP apresentaram maior taxa de detecção de cio (40,92%) e fertilidade (cio: 60,39%; 75/126 e não cio: 37,31%; 46/125). Entretanto, esta proporção de animais em estro não foi suficiente para promover aumentos significativos na taxa de concepção dos grupos CIDR1-48h e CIDR3-48h. Cerri et al. (2004), observaram que o aumento do diâmetro do maior folículo no momento da IATF afetou positivamente a proporção de vacas detectadas em estro após o tratamento com ECP. Nesse estudo, novilhas tratadas com ECP e detectadas em estro apresentaram maior diâmetro folicular no dia 9 (figura 28) e momento da IATF (11,45 mm) em relação as não observadas em estro (10,29 mm). Essa relação demonstra que a suplementação com E<sub>2</sub> exógeno alterou apenas a fertilidade das novilhas com folículos adequados no momento da IATF

(maduros), concordando com os resultados de Souza et al. (2007), que verificaram que a adição de 1 mg de ECP 48 h antes da aplicação do 2° GnRH (OvSynch) incrementou a fertilidade, apenas das vacas leiteiras com folículos entre 15 e 19 mm no momento da IATF.

O emprego de dispositivo previamente utilizado constitui alternativa para o aumento do diâmetro folicular e taxa de concepção (DIAS et al., 2009). Porém, assim como no experimento 2, outros estudos (PFEIFER et al., 2009 e PEGORER FIGUEIRA et al., 2011) falharam em demonstrar aumento na concepção através da redução dos níveis de progesterona. Nesses estudos, os autores concluíram que outros fatores, além do diâmetro folicular interferiram na fertilidade dos animais. Peres et al. (2009) verificaram que a concepção de vacas Nelore não lactantes sincronizadas com dispositivo de 1° uso por 9 dias foi superior quando a administração de PGF2 $\alpha$  foi antecipada para o dia 7. Possivelmente, esta estratégia incrementou a fertilidade das novilhas sincronizadas com CIDR de 1° uso, impedindo que grandes diferenças na taxa de concepção fossem detectadas entre os grupos tratados com dispositivo de 1° e 3° uso.

Além disso, na figura 23 observa-se queda na probabilidade de concepção quando os folículos atingem aproximadamente 14,0 mm de diâmetro. Considerando as análises de diâmetro folicular no momento da IATF, verifica-se que novilhas tratadas com CIDR de 3° uso apresentaram maior proporção de folículos superiores a 14,0 mm do que os animais com implante de 1° uso (CIDR3: 13,64%; 54/396 vs CIDR1: 7,92%; 32/404,  $p < 0,01$ ). Portanto, uma maior proporção de animais apresentou comprometimento da fertilidade, em consequência da possível formação de folículos persistentes que resultam em queda da fertilidade (MIHM et al., 1994 e AUSTIN et al., 1999).

Baruselli et al. (2004), Dias et al. (2009), Peres et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010a) relataram efeito positivo da administração de eCG na taxa de prenhez de novilhas púberes. A eCG é uma gonadotrofina capaz de se ligar a receptores de LH e FSH (MURPHY e MARTINUK, 1991), por isso Peres et al. (2009) demonstraram que a aplicação de 200 UI de eCG foi suficiente para promover o aumento do crescimento folicular. Essa é uma estratégia largamente empregada para estimular o desenvolvimento folicular final, embora Pegorer Figueira et al. (2011) tenham verificado que o uso de 300 UI de eCG não permitiu o aumento do diâmetro do folículo ovulatório e melhora da taxa de prenhez de novilhas púberes recebendo 2mg de estradiol no início do protocolo. Os resultados do experimento 3 demonstraram que o

tratamento com 200 UI de eCG foi eficiente em aumentar a taxa de sincronização e elevar as concentrações séricas de  $P_4$  pós IATF, concordando com os resultados de Baruselli et al. (2004), Peres et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010).

Soumano e Price (1997) detectaram maior expressão da proteína StAR em folículos de novilhas *Bos Taurus* superovuladas com eCG. Os autores correlacionaram esse achado com as maiores concentrações de progesterona e estradiol encontrado durante o tratamento com eCG. Em estudo subsequente, Soumano et al. (1998) verificaram que o mesmo tratamento aumentou os níveis de mRNA-rLH e diminuiu as concentrações de mRNA-rFSH. A partir desses resultados é possível especular que o tratamento com 200 UI de eCG alterou as características do folículo dominante, permitindo maior resposta ao estímulo ovulatório e aumento da síntese de progesterona. Ainda que o eCG tenha melhorado a taxa de ovulação e a produção de  $P_4$ , o tratamento não incrementou a taxa de concepção/prenhez em relação aos demais tratamentos (experimento 3). Na figura 31, é possível constatar que não houve efeito do diâmetro folicular na probabilidade de concepção de novilhas tratadas com eCG. Peres et al. (2009) observaram aumento da taxa de concepção em animais com altas concentrações séricas de  $P_4$  ( $> 3,0$  ng/ml) no dia da retirada do dispositivo. Posteriormente, Sá Filho et al. (2010b) verificaram incremento na taxa de ovulação de novilhas com folículos pequenos (4-8 mm). Esses dados em conjunto demonstram que o eCG parece ser uma alternativa eficiente para melhorar a fertilidade de folículos imaturos, no entanto pode prejudicar os resultados de animais com folículos maiores (figura 31). É possível que esse seja o motivo da ausência de efeito do eCG, quando este é empregado em protocolos com dispositivos contendo menor concentração de  $P_4$  que proporcionam maior diâmetro folicular (DIAS et al. 2009, PERES et al. 2009 e BUTLER et al. 2011).

A redução da dose de BE (experimento 3) foi eficiente em produzir folículos cujo diâmetro médio não diferiu do tratamento com eCG, proporcionando taxas de concepção/prenhez similares entre os dois grupos. Burke et al. (2003) demonstraram que o aumento das concentrações de FSH que precedem o início da nova onda folicular variou de acordo com a dose de benzoato de estradiol empregada. Bastos et al. (2011) observaram que a emergência folicular de vacas Nelore e Holandesa não lactantes, tratadas com 1 mg de BE +  $P_4$ , ocorreu antecipadamente (1mg:  $3,0 \pm 0,3$ ; 2mg:  $3,3 \pm 0,1$  e 4mg:  $3,8 \pm 0,2$  dias) e o diâmetro folicular 9 dias após o início do protocolo de sincronização foi superior (1mg:  $12,5 \pm 0,7$ ; 2mg:  $11,3 \pm 0,7$  mm e 4mg:

10,4 ± 0,7). Portanto, a administração de uma dose reduzida de BE é uma alternativa viável que pode ser utilizada em protocolos de sincronização de novilhas púberes.

Outra maneira de se obter folículos maiores é através da extensão do tempo de dominância folicular, que pode ser feita de acordo com a manipulação dos níveis de progesterona (ADAMS et al., 1992, UTT et al., 2003 e KOJIMA et al., 2003). Os resultados do experimento 3 demonstram que não houve diferença no diâmetro folicular médio quando o dispositivo foi removido um dia depois em relação aos demais tratamentos. Entretanto, a taxa de prenhez desse grupo foi significativamente inferior ao grupo 2 (200 UI de eCG ) e numericamente mais baixo que o grupo 1 (1 mg de BE). Adams et al. (1992) observaram que o aumento das concentrações séricas de P<sub>4</sub> durante a fase de crescimento do folículo dominante da primeira onda folicular, suprimiu o desenvolvimento folicular e encurtou o tempo de dominância folicular. Similarmente Kojima et al., (2003), falharam em induzir persistência do folículo dominante durante o tratamento com altas concentrações de progesterona por 16 dias. Segundo Kojima et al., (2003) o aumento dos níveis de progesterona diminuem os pulsos de LH e induzem a atresia do folículo dominante. Ao contrário do que ocorreu no experimento 2 (figura 24), no qual folículos maiores (>14,0 mm) provavelmente são folículos persistentes. No experimento 3 é provável que os folículos menores do tratamento CIDR 10 dias sejam na verdade folículos dominantes que se tornaram atrésicos, devido aos níveis elevados de progesterona por maior período de tempo. Explicando assim a queda da fertilidade observada na figura 31, quando folículos menores estiveram presentes no momento da IATF.

Além dos efeitos do diâmetro do folicular no momento da IATF, é importante destacar que a progesterona pós-IA também desempenha papel fundamental na fertilidade dos animais (VASCONCELOS et al., 2001, MUSSARD et al., 2007 e PERRY et al., 2005) e assim como nesse estudo a produção de P<sub>4</sub> esteve diretamente correlacionada com o aumento do diâmetro do FD (PERES et al. 2009). Neste caso não é possível atribuir maior concepção apenas as concentrações elevadas de P<sub>4</sub>, pois outros fatores que afetam a fertilidade estão associados à indução da ovulação de folículos de maior diâmetro (VASCONCELOS et al., 2001, MUSSARD et al., 2007 e PERRY et al., 2005).

Portanto mesmo que Bridges et al. (2010) tenha demonstrado a importância da duração do proestro sobre a fertilidade, este não é o fator limitante no protocolo convencional. Parece que o principal entrave no protocolo de sincronização em

novilhas púberes é a grande proporção de folículos pequenos (imaturos) presente no momento da IATF.

## 5. CONCLUSÕES

- A maior concentração de  $P_4$  diminui o desenvolvimento folicular no dia 7 do protocolo de sincronização;
- A aplicação de  $PGF2\alpha$  e a manutenção do dispositivo de progesterona por mais de 7 dias resultou em um estro mais fértil;
- O atraso do momento da IATF não aumentou a taxa de concepção;
- Novilhas com folículos entre 11,0 e 14,0 mm apresentaram maior taxa de concepção, constituindo-se um bom parâmetro de fertilidade;
- No momento da IATF 36% das novilhas apresentaram folículos menores que 11,0 mm, constituindo um entrave para obtenção de bons resultados em protocolos de sincronização;
- O diâmetro folicular no momento da IATF interfere na produção de  $P_4$  no diestro subsequente alterando a probabilidade de concepção;
- O CIDR de 3° uso diminuiu as concentrações de  $P_4$  possibilitando aumentar a taxa de ovulação, entretanto não houve aumento na taxa de concepção;
- O uso de 200 UI de eCG no dia 9 aumentou a taxa de concepção de novilhas com folículos pequenos (imaturos), no momento da IATF;
- A administração de 1mg de BE permitiu obter taxa de concepção/prenhez similar ao protocolo padrão com 200 UI de eCG;
- A extensão do tempo de dominância folicular com o CIDR por 10 dias prejudicou a fertilidade das novilhas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABREU, F. M.; CRUPPE, L. H.; ROBERTS, C. A.; JINKS, E. M.; POHLER, K. G.; DAY, M. L.; GEARY, T. W.; The effect of follicle age on pregnancy rate in beef cows. In: Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science. **Proceedings...v. 62**, 2011a.

ABREU, F. M. et al. Effect of follicle age on conception rate in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 253, E-Suppl1, 20011b.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers **Journal Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 627 - 640, 1992.

AHMAD, N. et al. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 13 -28, 1997.

AUSTIN, E. J. et al. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2219 - 2226, 1999.

BARUSELLI, P.S. et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: **International Congress on Animal Reproduction**, 2004.

BASTOS, M. R.; SURJUS, R. S.; PRATA, A. B.; MESCHIATTI, M. A. P.; BORSATO, M.; MOURÃO, G. B.; PEDROSO, A. M.; PIRES, A. V.; SARTORI, R. Efeito da dose de benzoato de estradiol em associação à progesterona na sincronização da emergência da onda folicular em vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2011. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39 (Suplemento 1). p. 376, 2011. Fortaleza – CE.

BERGFELD, E. G. M. et al. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 $\beta$ -estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 546 - 553, 1996.

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

BRIDGES, G. A. et al. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 208 - 215, 2010.

BRIDGES, G. A. et al. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, p. 843 – 851, 2008.

BRIDGES, P. J. et al. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p. 573 – 583, 1999.

BURKE, C. R. et al. 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, 2003.

BUTLER, S. A. A. et al. Pregnancy rates after fixed-time artificial insemination of Brahman heifers treated to synchronize ovulation with low-dose intravaginal progesterone releasing devices, with or without eCG. **Theriogenology**, v.76, p.1416 – 1423, 2011.

CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers, **Animal Reproduction Science**, v. 98, p.189 – 196, 2006.

CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167 – 175, 2008.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G. K. L.; MACMILLAN, A. L. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronisation of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of

the oestrus cycle and concentrations of progesterone following ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p.177 - 193, 2004.

CERRI, R. L. A. et al. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 87, p. 3704 - 3715, 2004.

CLARO JÚNIOR I. et al. Reproductive performance of prepubertal Bos indicus heifers after progesterone based treatments. **Theriogenology**, v. 74, p. 903 – 911, 2010.

DIAS, F. C. F. et al. Effect of length progesterone exposure during ovulatory wave development on pregnancy rate. **Theriogenology**, in press, 2011

DIAS, C. C. et al. Progesterone concentrations, exogenous eCG and timing of prostaglandin F2a treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 378 – 385, 2009.

DORSEY, B. R. et al. Effect of time from estrus to AI on pregnancy rates in estrous synchronized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 1 - 6, 2011.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 406 – 414, 2007.

FIELDS, M. J. et al. A reevaluation of artificial insemination in beef cattle. **Journal of Animal Science**. v. 41, p. 352 (Abstr.), 1975.

GEISERT, R. D. et al. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 16, p. 11 - 25, 1988.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Relationship between follicular development and the decline in the follicles-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 72 – 77, 1999.

GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852 - 858, 2008.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187 – 1194, 1996.

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

KOJIMA, F. N. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 187 - 211, 2003.

LOPEZ, H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**. v. 72, p. 788 - 795, 2005.

LOWMAN BG, SCOTT N, SOMERVILLE, S. Condition scoring of cattle. Bulletin East Scotland College Agriculture, n°6, 1976

MANTOVANI, A.P. et al. Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* x *Bos Taurus* heifers submitted to different PGF<sub>2</sub> $\alpha$ /progesterone-based synchronization protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p.91 - 96, 2010.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle: I. Basis for development of protocols. **Theriogenology** , v. 72, p. 179 – 189, 2009.

MIHM, M. et al. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 123 - 130, 1994.

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

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 1305 – 1319, 1991.

MUSSARD, M. L. et al. Influence of premature induction of luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 937 - 943, 2007.

PEGORER FIGUEIRA, M. et al. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nelore heifers. **Theriogenology** , v. 75, p. 17 - 23, 2011.

PERES, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination **Theriogenology** , v. 72, p. 681 – 689, 2009.

PERES, R. F. G.; CARDOSO, B. L.; PEREZ, G. C.; SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Fatores que interferem na fertilidade de novilhas Nelore submetidas a protocolos de sincronização de cio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007 **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Suplemento 3). p. 949, 2007, Costa do Sauípe – BA.

PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.85, p. 684 - 689, 2007.

PERRY, G. A. et al. Relationship between follicle size pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 5268-5273, 2005.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 1237 - 1250, 2009.

PINHEIRO, O. L. et al. 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.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotrophin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v. 122, p. 2222 - 2231, 1988.

ROELOFS, J. B. et al. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryos characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173 – 2181, 2006.

SÁ FILHO, M. F. et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p. 455 – 463, 2011.

SÁ FILHO, M.F. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 23 - 30, 2010a.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010b.

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382 – 2394, 2005.

SOUMANO, K.; LUSSIER, J. G.; PRICE, C. A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 156, p. 373 - 378, 1998.

SOUMANO, K.; PRICE, C. A. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger

ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 516 - 522, 1997.

SOUZA, A.H. et al. Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.90, p. 4623-4634, 2007.

TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E. K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2985 - 2991, 1996.

UTT, M. D.; JOUSAN, F. D.; BEAL, W. E. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81. p. 1562 - 1567, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 56, p. 307 - 314, 2001.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONCLUSÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES**

### **Conclusões Gerais e implicações:**

Os resultados desses experimentos demonstraram que a extensão ou redução do período de dominância folicular através da manipulação do tempo de permanência do CIDR interferiram na fertilidade de novilhas púberes. De acordo com o experimento 1, a aplicação de PGF2 $\alpha$  seguido da manutenção do dispositivo de P<sub>4</sub> por mais 2 dias foi suficiente para reduzir os níveis séricos de P<sub>4</sub> e proporcionar um estro mais fértil. Quando o mesmo protocolo foi utilizado para inseminação em tempo fixo, maiores taxas de concepção não ocorreram com o aumento da duração do proestro, devido a grande proporção de novilhas com folículos imaturos. Dados da literatura e desse experimento demonstram que os níveis de progesterona exercem papel fundamental no desenvolvimento folicular, o qual está diretamente relacionado com a probabilidade de concepção. Entretanto, o emprego do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> previamente utilizado por 18 dias não permitiu incrementos na taxa de concepção de novilhas submetidas à IATF. É provável que o momento da aplicação da PGF2 $\alpha$  impediu que grandes diferenças fossem notadas entre as novilhas sincronizadas com CIDR1 e CIDR3. Nesse estudo o diâmetro folicular foi o melhor preditor de fertilidade, nesse sentido estratégias que maximizem o diâmetro folicular potencialmente melhoram a concepção. Dessa forma a taxa de concepção/ prenhez obtida com o emprego de 1ml de BE foi similar ao protocolo convencional com 200 UI de eCG, sinalizando que essa dose de BE pode ser utilizada em protocolos de sincronização.

Em conjunto, os dados desse estudo sugerem que o tempo de dominância folicular desempenha papel fundamental na fertilidade de novilhas púberes e o diâmetro folicular interfere de maneira significativa na taxa de concepção desses animais. Desse modo, novos estudos se fazem necessário para avaliar o motivo da grande proporção de novilhas Nelore com folículos imaturos no momento IATF, bem como os mecanismos através dos quais as concentrações de progesterona interferem na fertilidade de novilhas púberes.

Dessa forma as implicações práticas desse estudo são:

- 1- A manutenção do dispositivo de P<sub>4</sub> por 2 dias a mais após a aplicação da PGF2 $\alpha$  implicou em maior taxa de concepção após a detecção de cio com menor dispersão do estro, favorecendo a implementação da IATF;

- 2- O proestro não é um fator limitante no protocolo convencional, portanto o atraso do momento da IATF não alterou a taxa de concepção;
- 3- O diâmetro do folículo no momento da IATF é um bom parâmetro de maturidade folicular;
- 4- A taxa de concepção não foi alterada pelo número de usos do dispositivo intravaginal de progesterona;
- 5- O emprego do CIDR por 10 dias diminuiu a taxa de prenhez;
- 6- A redução da dose de BE proporcionou resultados similares aos encontrados com protocolo de sincronização convencional com 200 UI de eCG.