

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TAXAS DE OVULAÇÃO E PREENHEZ EM NOVILHAS NELORE CÍCLICAS
APÓS UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
EM TEMPO FIXO (IATF), COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
PROGESTERONA, ASSOCIADAS OU NÃO A APLICAÇÃO DE eCG**

MARCELO FIGUEIRA PEGORER

Botucatu – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TAXAS DE OVULAÇÃO E PREENHEZ EM NOVILHAS NELORE CÍCLICAS
APÓS UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
EM TEMPO FIXO (IATF), COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
PROGESTERONA, ASSOCIADAS OU NÃO A APLICAÇÃO DE eCG

MARCELO FIGUEIRA PEGORER

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Ciro Moraes Barros

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Pegorer, Marcelo Figueira.

Taxas de ovulação e prenhez em novilhas Nelore cíclicas após utilização de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com diferentes concentrações de progesterona, associados ou não a aplicação de eCG / Marcelo Figueira Pegorer. – Botucatu [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 50501054

1. Bovino - Reprodução - Estudos experimentais 2. Ovulação 3. Inseminação artificial 4. Obstetrícia veterinária

CDD 636.20824

Palavras-chave: IATF; eCG; Inseminação artificial; Novilhas Nelore; Progesterona

Nome do Autor: Marcelo Figueira Pegorer

Título: TAXAS DE OVULAÇÃO E PRENHEZ EM NOVILHAS NELORE CÍCLICAS APÓS UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF), COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA, ASSOCIADAS OU NÃO A APLICAÇÃO DE eCG

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
Presidente e Orientador
Departamento de Farmacologia
IBB – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UEL – Londrina

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho
Membro
Departamento de Produção Animal
ESALQ – USP - Piracicaba

Data da Defesa: 27 de Abril de 2009.

Dedico este trabalho...

A minha esposa **ANDREIA** e ao meu filho **MATHEUS**,
pela força e compreensão nos momentos mais difíceis.

Agradeço...

Especialmente ao meu orientador, Professor Dr. Ciro Moraes Barros, pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus pais Neide e José, que me ensinaram a acreditar e sempre seguir lutando, e aos meus irmãos Marinho, Luciana e Eliziel.

À Professora Dra. Luzia Trinca pela paciência e colaboração nas análises estatísticas.

À Professora Dra. Eunice Oba, pela colaboração nas dosagens plasmáticas de progesterona.

Aos meus amigos: Paulo Fernandes, Renato Simões, Thais Naban, Vinicius Pinheiro, Eduardo, Fernanda, Cínthia, Carolina.

Agradeço, especialmente, aos amigos Ronaldo Ereno e Rafael Satrapa pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos;

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos e pela amizade criada durante a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ e do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu).

Aos proprietários das fazendas Cristal, Estância Rosalito, Sr. Rosário Pegorer, e Fazenda Pontal, Sr. Pedro Pegorer, por ceder suas instalações e animais.

Aos funcionários das fazendas onde os experimentos foram realizados, que colaboraram direta ou indiretamente para obtenção dos dados.

A empresa Biogenesis-Bagó, pelos produtos hormonais cedidos para a realização dos experimentos e seu representante o Sr. Reuel Gonçalves.

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Peso (média $\pm$ EPM) de novilhas Nelore, ao início (D0) e ao final do experimento (D12), tratadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g (grupo 1G) de progesterona e suas associações com PGF2 α (grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF) submetidas a exames diários de ultrassonografia transretal..... 40
- Tabela 2 - Efeito do nível de progesterona do dispositivo intravaginal (0,558g ou 1g) e da PGF2 α nos parâmetros de recrutamento e crescimento folicular em novilhas Nelores tratadas para sincronização da ovulação..... 41
- Tabela 3 - Taxas de sincronização do folículo dominante (animais com folículos >5mm no D9/ total de animais tratados), ovulação e prenhez em novilhas Nelores sincronizadas com diferentes níveis de progesterona, associadas (0,5G/PGF; 1G/PGF) ou não (0,5G; 1G) à PGF2 α no dia da inserção do dispositivo intravaginal..... 44
- Tabela 4 - Taxa de sincronização do folículo dominante (folículos > 5mm no D9/ total de animais tratados), diâmetro folicular (média $\pm$ EPM) no D9 e taxas ovulação e prenhez, em novilhas Nelores cíclicas sincronizadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g (grupo 1G) de progesterona e com PGF2 α no D0, associadas (0,5G/PGF/eCG; 1G/PGF/eCG) ou não (0,5G/PGF; 1G/PGF) a 300 UI de eCG na retirada do dispositivo (D8).... 46
- Tabela 5 - Concentração plasmática de progesterona (média $\pm$ EPM) no início (D0) e no dia da retirada do dispositivo intravaginal (D8) em novilhas Nelores cíclicas tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558 (grupo 0,5G) ou 1 g (grupo 1G) de P4 associados à PGF2 no D0..... 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Protocolo para pré-sincronização (D -17 a D -5) e sincronização (D 0 a D 12) do ciclo estral de novilhas Nelores cíclicas utilizando dispositivo intravaginal contendo 1 ou 0,558 g de progesterona, associadas ou não a aplicação de 150µg de PGF2α no D0. O crescimento folicular foi acompanhamento por meio de exames de ultrassonografia realizados diariamente entre os dias 0 e 8, e a cada 12 horas entre os dias 9 e 12..... 33
- Figura 2 - Protocolo para sincronização da ovulação de novilhas Nelores cíclicas utilizando dispositivos intravaginais contendo 1 (grupo 1G) ou 0,558g (grupo 0,5G) de progesterona, associadas (grupos 1G/PGF e 0,5G/PGF) ou não a PGF2α no início do tratamento (D0)..... 36
- Figura 3 - Concentração plasmática de progesterona em novilhas Nelores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g de P4 (grupo 1G) associadas (0,5G/PGF; 1G/PGF) ou não à PGF2α no D0..... 42
- Figura 4 - Níveis plasmáticos de progesterona em novilhas Nelores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558 g (grupo 0,5G) ou 1 g (grupo 1G) de P4..... 43
- Figura 5 - Níveis plasmáticos de progesterona em novilhas Nelores tratadas (com PGF) ou não (sem PGF) com 150 µg de PGF2α (d-cloprostenol) no D0..... 43
- Figura 6 - Probabilidades de ovulação e de prenhez em novilhas Nelores cíclicas de acordo com o diâmetro do folículo dominante, determinadas no dia 9 do protocolo de sincronização da ovulação, utilizando benzoato de estradiol (2mg, IM) e dispositivo intravaginal de progesterona durante 9 dias, 150 µg de d-croplostenol no dia da retirada do dispositivo e benzoato de estradiol vinte e quatro horas mais tarde (n = 143)..... 47

- Figura 7 - Taxas de ovulação e de prenhez em novilhas Nelores cíclicas de acordo com o diâmetro do folículo dominante, determinadas no dia 9 do protocolo de sincronização da ovulação, utilizando benzoato de estradiol (2mg, IM) e dispositivo intravaginal de progesterona durante 9 dias, 150 µg de d-croptostenol no dia da retirada do dispositivo e benzoato de estradiol (1 mg, IM) vinte e quatro horas mais tarde (n = 143)..... 48
- Figura 8 - Percentagem de novilhas Nelores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558g (n = 67) ou 1g (n = 76) de P4 que apresentaram no dia 9 do protocolo de sincronização do estro, diâmetros de 5 a 7; 7,1 a 8,5; 8,6 a 10 e >10 mm. 49

LISTA DE ABREVIATURAS

IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
P4	progesterona
E ₂	estradiol
BE	benzoato de estradiol
PGF2 α	prostaglandina F2 α
D	día
LH	hormônio luteinizante
IA	inseminação artificial
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
IGF-1	fator de crescimento ligado à insulina
bST	somatotropina
CL	corpo lúteo
E2	estradiol
LHR	receptor de LH
ECP	cipionato de estradiol
PEPE	P4-BE-PGF2 α -BE
g	grama
mL	miliLitro
0,5G	tratamento com dispositivo intravaginal com 0,558 g de P4
1G	tratamento com dispositivo intravaginal com 1g de P4
SG	colheita de sangue
US	exame ultrassonográfico

IM	intramuscular
Kg	quilograma
mg	miligrama
MHz	megaHertz
EPM	erro padrão da média
Ø FD	diâmetro do folículo dominante
ng	nanograma
CIDR	dispositivo intravaginal liberador de progesterona
TRIU B	dispositivo intravaginal liberador de progesterona
Cronipres [®]	dispositivo intravaginal liberador de progesterona

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 <i>Dinâmica folicular</i>	19
2.2 <i>Sincronização do estro e ovulação</i>	23
2.2.1 GnRH.....	24
2.2.2 Progesterona e estradiol.....	25
2.2.3 Gonadotrofina coriônica equina (eCG).....	27
3 OBJETIVOS.....	29
4 HIPÓTESES A SEREM TESTADAS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Experimento 1.....	31
5.2 Experimento 2.....	35
5.3 Experimento 3.....	38
6 RESULTADOS.....	40
7 DISCUSSÃO.....	51
8 CONCLUSÕES.....	56
9 COMENTÁRIOS FINAIS.....	57
10 REFERÊNCIAS.....	58
TRABALHO CIENTÍFICO.....	69

PEGORER, M.F. **Taxas de ovulação e prenhez em novilhas Nelore cíclicas após utilização de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com diferentes concentrações de progesterona, associadas ou não a aplicação de eCG.** Botucatu, 2009. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Alguns estudos indicam que altos níveis de progesterona (P4) plasmática diminuem a pulsatilidade de LH e, conseqüentemente, o crescimento folicular. Isto pode diminuir a eficiência de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que se baseiam na utilização de dispositivos intravaginais contendo P4. Objetiva-se com o presente trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações de P4, associadas ou não à aplicação de eCG, nas taxas de ovulação e prenhez de novilhas da raça Nelore submetidas a protocolos para IATF. No experimento (exp.) 1, novilhas Nelore (n=15), cíclicas e pré-sincronizadas com tratamento hormonal, foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais. No dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0) todos os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e um dispositivo intravaginal contendo 0,558g de P4 (Triu B[®], grupo 0,5G, n = 4) ou 1g de P4 (Cronipress[®], grupo 1G, n = 4), ou 0,558g de P4 e PGF2 α (150 μ g d-cloprostenol, grupo 0,5G/PGF, n = 4) ou 1 g de P4 e PGF2 α (grupo 1G/PGF, n = 3). Oito dias mais tarde (D8) administrou-se PGF2 α em todos os animais e o dispositivo foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do dispositivo intravaginal, as novilhas foram tratadas com BE (1 mg, IM). Entre os dias D0 e D12 foram realizados, diariamente, exames ultrassonográficos dos ovários e mensurado o diâmetro folicular. Foram colhidas amostras de sangue para dosagem da P4 nos dias 0,1,2,4,8 e 10. No exp. 2, novilhas cíclicas da raça Nelore (n=292) foram tratadas com os mesmos protocolos do primeiro experimento. Entretanto, 30 a 36h após a aplicação do BE todos os animais foram submetidos a IATF (D10). Em uma amostragem de novilhas de cada grupo os ovários foram examinados, por meio de ultrassonografia, nos dias 9 e 12, para determinar a taxa de ovulação após cada tratamento. No exp. 3, novilhas Nelore cíclicas (n=459) receberam os tratamentos descritos para os grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF, associados à administração de 300 UI de eCG (grupos 0,5G/PGF/eCG e 1G/PGF/eCG) no momento da retirada do dispositivo (D8). Foram realizadas, em alguns animais de cada grupo, colheitas de sangue para dosagem da P4 plasmática (D8), e exames ultrassonográficos dos ovários para determinação do diâmetro do folículo dominante no D9 e taxa de ovulação no D12. Para comparação dos níveis plasmáticos de P4 foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas e as variáveis binomiais (taxa de ovulação e prenhez) foram analisadas por meio de regressão logística. No exp.1, as concentrações plasmáticas de progesterona foram maiores nos animais que receberam o dispositivo contendo 1 g de P4 do que aqueles que receberam o dispositivo contendo 0,558g de P4; e menores nas novilhas que receberam PGF2 α no D0.

Tanto no segundo quanto no terceiro experimentos, não houve diferença significativa nas taxas de ovulação (65 a 77%) e prenhez (exp. 2: 26 a 33%; exp.3: 39 a 43%) nas novilhas dos diversos grupos experimentais. No terceiro experimento os animais tratados com dispositivos contendo menores concentrações de P4 apresentaram maior diâmetro do folículo dominante ($10,3 \pm 0,2$ vs $9,3 \pm 0,2$ mm; $P < 0,01$) no D9. Conclui-se que a redução da concentração de P4 no dispositivo intravaginal (1,0 vs 0,558g) ou a administração de $\text{PGF2}\alpha$ no início dos tratamentos, diminuem as concentrações plasmáticas de P4 entre os dias 1 e 8 dos protocolos de IATF. Entretanto, embora a utilização de dispositivos intravaginais contendo menos progesterona tenha contribuído para o aumento do folículo dominante no D9, não alterou significativamente as taxas de ovulação e de prenhez das novilhas Nelore. Além disso, a associação de eCG aos protocolos de IATF não aumentou significativamente o crescimento folicular e as taxas de ovulação e prenhez dos animais.

Palavras-chave: IATF, progesterona, novilhas Nelore, inseminação artificial, eCG

PEGORER, M.F. **Ovulation and pregnancy rates in cyclic Nellore heifers after fixed-time artificial insemination protocols (FTAI) using different concentration of progesterone, associated or not with eCG.** Botucatu, 2009. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Previous reports indicate that high concentration of plasmatic progesterone (P4) decreases LH pulse frequency, and consequently follicular growth. This may reduce the efficiency of fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols that utilize P4 in *Bos indicus* heifers. The objective of the present work was to evaluate the influence of different P4 concentrations associated or not with eCG in the ovulation and pregnancy rates of Nellore heifers submitted to hormonal protocols for FTAI. In experiment (exp.) 1, heifers (n=15) pre-synchronized with a hormonal treatment were randomly allocated in four experimental groups. At the time of intravaginal device insertion (D0) all animals received 2 mg of estradiol benzoate (EB) and an intravaginal progesterone-releasing device containing 0.558g of P4 (TRIU[®], group 0.5G, n=4) or 1g of P4 (Cronipress[®], group 1G, n = 4), or 0.558g of P4 and PGF2 α (150 μ g d-cloprostenol, group TRIU/PGF, n = 4), or 1g of P4 and PGF2 α (group 1G/PGF, n = 3). Eight days later (D8), PGF2 α (150 μ g d-cloprostenol) was administered to all heifers, the P4 source was removed. Twenty four hours after removing the intravaginal device, the heifers were treated with EB (1 mg, i.m.). Ovarian ultrasonographic examinations were performed daily, from the day D0 to D12 to measure follicles diameter. Blood samples were collected during the days 0, 1, 2, 4, 8 and 10 to evaluate plasma P4 concentration. In exp. 2, cyclic Nellore heifers (n=292) were treated with the same protocols as in the exp. 1. However, 30 to 36 h later all animals were fixed-time inseminated on D10. In exp. 3, heifers (n=459) received the treatments described to groups 0.5G/PGF and 1G/PGF associated with 300 IU of eCG (i.m., groups 0.5G/PGF/eCG and 1G/PGF/eCG) at the time of intravaginal device removal (D8). In a subset of heifers from each group blood samples were collected on D8 and ovarian ultrasonography was performed to determine the diameter of the dominant follicle on D9 (exp.3) and the ovulation rate on D12 (exp. 2 and 3). The analysis of variance to repeated measurements was used to compare progesterone levels, and the binary variables (ovulation and pregnancy rates) were analyzed by logistic regression. In exp. 1 P4 concentrations were higher in animals that had received the device content 1g of P4 than in those that had received the device content 0.558g of P4, and lower in heifers that had received PGF2 α on D0. In both exp. 2 and 3 there was no difference on ovulation (65 to 77%) and pregnancy (exp. 2: 26 to 33%; exp.3: 39 to 43%) rates among the several groups. In exp. 3, the animals which received the devices with a lower concentration of P4 had a larger diameter of the dominant follicle (10.3 $\pm$ 0.2 vs 9.3 $\pm$ 0.2 mm; P<0.01) on D9. It is concluded that reduction of P4 concentration in the intravaginal device (1.0 to 0.558g) or the administration of PGF2 α at the beginning of the treatments

decrease blood concentrations of P4 between days 1 and 8 of the FTAI protocols. However, although the use of intravaginal devices with 0.558g of P4 contributed to increase the dominant follicle diameter on D9, there was no significant increase on ovulation and pregnancy rates. Additionally, the association of eCG to FTAI protocols did not improve follicular growth or ovulation and pregnancy rates.

Key-words: FTAI, progesterone, Nellore heifers, artificial insemination, eCG

1- INTRODUÇÃO

A maioria dos rebanhos bovinos está localizada em regiões tropicais e subtropicais do planeta, onde ocorrem altos índices pluviométricos e altas temperaturas. Nestas regiões predominam os animais *Bos indicus*, devido a sua conhecida rusticidade, alta resistência aos ectoparasitas e grande capacidade de adaptação a ambientes adversos.

É consenso entre a comunidade científica e os criadores que a técnica de inseminação artificial (IA) é uma importante ferramenta para acelerar a evolução genética dos rebanhos. Um dos maiores entraves para o amplo uso desta biotécnica é a detecção do estro (cio), por requerer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas bovinas a curta duração (em torno de 11 horas) associada à incidência de estro noturno (PINHEIRO et al., 1998), dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA (BARROS et al., 1995, PINHEIRO et al., 1998, MIZUTA, 2003).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (PIERSON & GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar cio) em taurinos (TWAGIRAMUNGU et al., 1992a,b; THATCHER et al., 1993; PURSLEY et al., 1994) e zebuínos (BARROS et al., 1998; FERNANDES et al., 2001).

Existem diversos protocolos hormonais que resultam taxas de prenhez em vacas ao redor de 50 a 60% (BARUSELLI et al., 2004; CUTAIA et al., 2003). No entanto, os resultados obtidos em novilhas zebuínas são menores, de 15 a 47% (MARQUES et al, 2005; PERES 2008, DIAS 2007). Uma possível explicação refere-se às altas taxas plasmáticas de progesterona nos programas que utilizam dispositivos intravaginais de progesterona/progestágenos, causando retroalimentação negativa na

hipotálamo e consequentemente menor pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH; BERGFELD et al., 1995; BURKE et al., 1996, CALLEJAS et al., 2006). Como consequência desse processo ocorre menor crescimento do folículo dominante e menores taxas de ovulação e prenhez. Recentemente, Carvalho et al. (2008) demonstraram que a utilização de PGF2 α no D0 (dia da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona) em protocolo de IATF, reduz os níveis circulantes de progesterona ($5,2 \pm 0,1$ vs $3,3 \pm 0,0$ ng/mL; $P < 0,05$), levando a um maior crescimento do folículo dominante ($0,9$ vs $1,2$ mm/dia) e maiores taxas de ovulação ($52,7$ vs $79,4\%$).

Outro fármaco, a gonadotrofina coriônica equina (eCG), vem sendo bastante utilizado em protocolos de IATF, em vacas recém paridas, com o objetivo de melhorar o crescimento e a maturidade folicular. Sua atividade semelhante ao FSH e LH pode estimular o crescimento do folículo e/ou facilitar a ovulação (CAVALIERI et al., 1997). Em recente estudo sua utilização promoveu aumento nas taxas de prenhez das vacas em anestro pós-parto com baixa condição corporal (CUTAIA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004).

Desta forma, a utilização de dispositivos intravaginais com menores quantidades de progesterona (P4), ou ainda, qualquer mecanismo que possa reduzir os níveis circulantes de progesterona, como a utilização de PGF2 α no início do protocolo hormonal em novilhas cíclicas, e/ou o uso da eCG, poderiam melhorar o desenvolvimento folicular resultando em maiores taxas de ovulação e prenhez.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DINÂMICA FOLICULAR

O período entre dois estros consecutivos é denominado ciclo estral. Com o advento da avaliação da atividade ovariana através de ultrassonografia transretal, foi possível observar padrões de crescimento e regressão de folículos antrais em forma de ondas durante o ciclo estral bovino (SAVIO et al., 1988). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em todos os estágios da vida de uma fêmea, no período anterior à puberdade (ADAMS et al., 1992) durante a gestação (GINTHER et al., 1996) e no pós-parto (MURPHY et al., 1990; SAVIO et al., 1990).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos envolvendo principalmente os hormônios hipotalâmicos (GnRH), hipofisários (LH e FSH) e gonadais (estradiol, progesterona e inibina; HAFEZ, 1993).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo e após ser liberado na forma de pulsos (CLARKE et al., 1988) atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, onde determina a secreção das gonadotrofinas (LH e FSH). Essas gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e a secreção dos hormônios esteróides (STANISLAUS et al., 1998).

A emergência da onda folicular é caracterizada por um crescimento sincrônico de mais de 20 pequenos folículos com diâmetro a partir de 2 mm (CARVALHO et al., 2008; ERENO, 2008; GINTHER et al., 1989, ALVAREZ et al., 2000). O número de folículos recrutados em novilhas zebuínas geralmente é maior que nas taurinas (CARVALHO et al., 2008; ALVAREZ et al., 2000). GONG et al.(1996) acreditam que o número de folículos que emergem numa onda de crescimento está diretamente relacionado aos níveis circulantes de IGF-1, e que vacas tratadas com hormônio do crescimento [somatotropina (bST)] podem aumentar o número de folículos recrutados. Além disso, existem indicações (ALVAREZ et al., 2000) que os animais *Bos indicus*

apresentam níveis circulantes mais elevados de IGF-1. Desta forma, foi sugerido que os maiores níveis de IGF-1 plasmáticos encontrados nestes animais, seria uma das razões para a grande atividade folicular durante a emergência da onda (CARVALHO et al., 2008).

Cada onda folicular é precedida por um aumento nas concentrações circulantes de FSH (ADAMS et al., 1992). Após a emergência da onda, enquanto os folículos continuam a crescer, os níveis de FSH vão declinando até atingirem níveis basais (GINTHER et al., 1997). Essa queda nas concentrações de FSH se dá pela ação do estradiol (E2) e da inibina secretados pelos folículos em crescimento (GINTHER et al., 1996).

Aproximadamente 2,5 a 3,0 dias após a emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro de 6,2 a 8,4 mm para *Bos indicus* (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008) e cerca de 8,5 mm para *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996) ocorre o evento denominado de desvio folicular (GINTHER et al., 2001a). Desta forma, um folículo continua a crescer e se torna dominante, enquanto os demais folículos, denominados subordinados, sofrem regressão (MAPLETOFT et al., 2000).

Os mecanismos envolvidos no processo de desvio folicular são complexos e não compreendidos completamente. Sabe-se que neste momento as concentrações de FSH encontram-se em níveis basais (GINTHER et al., 1997). Fatores intrafoliculares também são candidatos a ativação deste processo, tais como sistema IGF, esteróides, os peptídeos ativina A e inibina A, receptores para gonadotrofinas entre outros (ARMSTRONG & WEBB, 1997; BERISHA et al., 2003, FORTUNE et al., 2004, IRELAND, 2004).

A expressão do LHR (receptor do hormônio luteinizante), em novilhas da raça Holandesa, foi detectado nas células da granulosa de folículos ≥ 8 mm (BAO et al. 1997; BEG et al. 2001), cerca de 8 horas antes do desvio folicular (BEG et al. 2001), o que levou Beg et al. (2001) e Ginther et al. (2001b), a sugerir que o início da expressão do LHR nas células da granulosa seria a causa para a seleção e conseqüentemente para a aquisição da dominância folicular. Entretanto, Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e Ereno (2008) utilizando RT-PCR, não detectaram a expressão do LHR no futuro folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. Recentemente, Nogueira et al. (2007) e Ereno (2008), verificaram que a

expressão do LHR em células da granulosa de fêmeas da raça Nelore ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular. Portanto, estes últimos achados não corroboram a hipótese de que expressão de LHR em células da granulosa ocorre antes da divergência folicular.

Está bem documentado que o estrógeno endógeno produzido pelos folículos ovarianos acentua a amplitude dos pulsos de LH durante a fase folicular do ciclo estral, através do aumento de receptores do hormônio liberador de LH na pituitária anterior e do conseqüente aumento da capacidade estrogênica dos folículos pré-ovulatórios (STUMPF et al., 1989). Esse mecanismo de retroalimentação positiva entre o E2 e o LH é crítico no processo de maturação final do folículo ovulatório, induzindo o comportamento estral e a ovulação (FIKE et al, 1997).

No início da fase de recrutamento folicular, os dois maiores folículos apresentam uma taxa de crescimento semelhante, mas após o desvio folicular, o folículo subordinado tem sua taxa de crescimento reduzida (GINTHER et al., 2001b; 2003; ERENO, 2008). Em vacas holandesas a taxa de crescimento do FD variou de 1,5 a 2,1 mm/dia antes do desvio (KULIK et al., 1999; GINTHER et al., 1997; GINTHER et al., 2001b) enquanto nas nelores variou de 0,9 a 1,4 mm/dia (CASTILHO et al., 2007; SARTORELLI et al., 2005).

Na presença de um corpo lúteo funcional e de níveis de P4 acima de 1 ng/mL, esse primeiro FD não é capaz de induzir o pico de LH, e nem provocar comportamento de estro e ovulação (FORTUNE, 1993). Segundo Roberson et al. (1989), na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona (acima de 5 ng/mL) há decréscimo na frequência de pulsos de LH. Desta forma, o folículo dominante acaba sofrendo atresia e não ovula. A presença do CL caracteriza a fase lútea do ciclo estral. Nesta fase, o CL produz P4 em quantidades crescentes do quarto ao décimo dia do ciclo estral e a secreção se mantém estável até que ocorra a luteólise, entre o 15° e o 20° dia (HAFEZ, 1993). O LH secretado pela adeno-hipófise é regulado pela P4 e E2 ovarianos. Durante a fase lútea do ciclo estral, ambos os hormônios inibem a secreção de LH por retro-alimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (CLARKE, 1988).

Após a luteólise a concentração plasmática de P4 regride a valores abaixo de 1 ng/mL, permitindo um aumento na frequência dos pulsos de LH

(WILTBANK et al., 2002). O aumento na frequência dos pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que passa a secretar quantidades crescentes de E2 (FORTUNE et al., 2001). O E2, na ausência de P4, estimula a síntese de receptores de GnRH na hipófise tornando-a mais sensível ao GnRH ao mesmo tempo que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (HANSEL & CONVEY, 1983) e estimula a síntese de gonadotrofinas, resultando no pico de LH (HURNIK, 1987) e consequente ovulação do folículo dominante (MUKASA-MUGERWA, 1989).

Existem vários trabalhos sobre a dinâmica folicular em zebuínos (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; ALVAREZ et al., 2000; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008) demonstrando que as características de crescimento folicular e dominância são similares aqueles dos taurinos exceto que os zebuínos aparentam ter um menor diâmetro máximo do FD (10-12 mm) e do CL (17-21 mm; FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008) do que as raças européias (14-20 mm e 20-30 mm, para o FD e CL respectivamente; KASTELIC et al., 1990; BO et al., 1993).

Carvalho et al. (2008), utilizando animais sincronizados com dispositivo intravaginal, constataram que o diâmetro máximo do FD foi menor em novilhas *B. indicus* quando comparadas às *B. taurus* ($9,5 \pm 0,5$ mm vs $11,6 \pm 0,5$ mm), assim como a taxa de crescimento do folículo dominante nas novilhas zebuínas foram menores do que aqueles encontrados nas raças européias ($0,9 \pm 0,1$ mm/dia vs $1,1 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente). Por isso, concluíram que o menor tamanho do FD está diretamente relacionado à sua menor taxa de crescimento.

Aquisição de capacidade ovulatória

Sartori et al. (2001) observaram que após a administração de 40 mg de LH, nenhuma vaca da raça Holandesa com folículo de 7,0 (0/9) ou 8,5 mm (0/9) ovulou, comparadas com 80% (8/10) de ovulações em vacas com folículos de 10 mm. Portanto, a capacidade ovulatória em *Bos taurus* foi verificada em folículos a partir de 10 mm de diâmetro, ou seja, um dia após o desvio folicular.

Gimenes et al. (2008), realizaram um experimento com novilhas Nelore, Gir e cruzadas (Nelore x Gir) a fim de verificar o diâmetro nos quais os folículos adquirem capacidade ovulatória. As fêmeas tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu diâmetro entre 7,0 e 8,4 mm; 8,5 e 10,0 mm e acima de 10,0 mm, apresentaram taxas ovulatórias de 33, 80 e 90%, respectivamente. De forma similar, em vacas da raça Nelore, a administração de LH induziu ovulação em 90% dos animais com folículos entre 9 e 10 mm e 20% nas vacas com folículos entre 7,5 e 8 mm de diâmetro (SIMÕES et al., 2009). Esses dados são sugestivos de que a capacidade ovulatória em *Bos indicus* é adquirida com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus*. Embora um aumento na expressão do LHR das células da granulosa seja necessário para a aquisição de dominância folicular, somente esse aumento parece não ser suficiente para a instalação plena da capacidade ovulatória. Tal mecanismo, ainda não elucidado, parece ser decorrente de um aumento, ainda maior, na quantidade de LHR, associada às alterações nas vias de sinalização intracelular que o LHR possui na fase pós-divergência.

2.2. SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO

O principal mecanismo de regulação do ciclo estral é a regressão do CL, que normalmente ocorre nas fêmeas bovinas ao redor do dia 16 a 18 do ciclo. Assim sendo, o CL é um fator chave em vários processos reprodutivos, tais como a ovulação e a duração do ciclo estral (MILVAE et al., 1996). As formas de controle do ciclo estral em bovinos estão baseadas na extensão ou redução da fase luteínica, utilizando progestágenos ou prostaglandinas, e na alteração da onda folicular, utilizando E2 ou GnRH (BURKE et al., 1996).

A PGF2 α é o tratamento mais comum utilizado para sincronização do cio em bovinos (revisado por ODDE, 1990). No entanto, a PGF2 α não induz a luteólise durante os primeiros 5 ou 6 dias após o estro (MOMONT & SEGUIN, 1984). Além disso, a manifestação do cio pode se estender por um período de até 6 dias, sendo influenciada pela capacidade de resposta do CL à droga (MOMONT & SEGUIN, 1984) e pela fase do desenvolvimento da onda folicular (KASTELIC & GINTHER, 1991).

Embora da administração de $\text{PGF2}\alpha$ resulte boas taxas de manifestação do estro nas fêmeas *B. taurus* (70-90%; GALINA & ARTHUR, 1990), os resultados em *B. indicus* têm sido bastante variáveis. Pinheiro et al. (1998) observaram manifestação de estro abaixo de 50%, mesmo na presença de CL funcional, quando administraram $\text{PGF2}\alpha$ em vacas nelores, com resultado bastante semelhante ao observado por Gambini et al. (1998), em vacas da raça Gir. A combinação de fatores, baixa e variável resposta do estro, mais a alta incidência de anestro dos animais mantidos em pastagens tropicais, explicam a baixa eficiência dos programas de sincronização do cio utilizando somente a $\text{PGF2}\alpha$ (CAVALIERI et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998).

Uma forma bastante eficiente, mas pouco utilizada de sincronizar a onda folicular consiste na ablação mecânica de folículos maiores de 5 mm de diâmetro, através da aspiração folicular guiada por ultrassom, resultando uma nova onda em torno de $1,9 \pm 0,1$ dias após o procedimento (BURATINI et al., 2000). No entanto, este procedimento se torna dispendioso pela necessidade de um aparelho de ultrassom e fica impraticável quando se trabalha com um grande número de animais. Desta forma a estratégia mais viável para sincronização de nova onda folicular refere-se à utilização de hormônios, como o GnRH ou o E2 associado à P4.

2.2.1 GnRH

O tratamento com GnRH induz a ovulação do folículo dominante, através da liberação hipofisária do LH. Em torno de 2 horas após sua administração, ocorre pico de LH e 24 a 32 horas é induzida a ovulação do FD, iniciando uma nova onda cerca de 2 dias após a aplicação (PURSLEY et al., 1995).

Vários protocolos foram propostos para sincronização do cio utilizando-se a combinação de GnRH e $\text{PGF2}\alpha$ (PURSLEY et al., 1997). Um destes tratamentos ficou conhecido como Ovsynch (PURSLEY et al., 1995) e consiste na aplicação de GnRH, sete dias após $\text{PGF2}\alpha$ e uma segunda aplicação de GnRH cerca de 48 horas após a $\text{PGF2}\alpha$ com a IATF 16 horas mais tarde. No entanto, a capacidade do GnRH em iniciar uma nova onda

folicular é limitada em vacas (66%; GEARY et al., 2000) e principalmente em novilhas (56%; PURSLEY et al., 1995). A falha em induzir ovulação na primeira aplicação de GnRH, resulta em baixa taxa de sincronização da onda folicular, o que comprometeria as taxas de concepção (PERRY et al., 2004). Infelizmente, as novilhas inseminadas após sincronização do estro, utilizando protocolo Ovsynch, apresentam taxas de concepção abaixo do ideal tanto para *B. taurus* (38,9%; revisado por DAY, 2005), quanto para *B. indicus* (21 e 43%; revisado por BO et al., 2003). Dados da literatura sugerem que novilhas apresentam menor resposta ovulatória à primeira aplicação de GnRH, por possuírem maior proporção de 3 ondas de crescimento folicular, resultando menores taxas de sincronização da onda (PURSLEY et al., 1995). Além disso, o diâmetro do folículo no momento da aplicação do GnRH influencia diretamente sua capacidade ovulatória (MARTINEZ et al., 1999; SARTORI et al., 2001), uma vez que a expressão de receptores de LH nas células da granulosa ocorre após o desvio folicular, em torno de 2,5 dias após a emergência da onda, quando o folículo atinge cerca de 8,5 mm de diâmetro (XU et al., 1995; GIMENES et al., 2008).

Outro fator limitante destes protocolos é a incidência de estro antes da IATF, que pode ocorrer devido a não sincronização ao primeiro GnRH (WILLIAMS et al., 2002; ROY et al., 1999). Williams et al. (2002) relataram que a inseminação das novilhas que mostraram estro antes da segunda injeção de GnRH, apresentaram um aumento nas taxas de prenhez de 42,4 para 57,5%. Uma alternativa bastante interessante para evitar ovulações antecipadas é a utilização de um dispositivo de P4 durante o protocolo.

2.2.2 PROGESTERONA E ESTRADIOL

As tentativas iniciais em sincronizar o cio em bovinos utilizando progestágenos baseavam-se no conhecimento de que a P4 previne a ocorrência de cio e ovulação (CHRISTIAN et al., 1948).

Estudos realizados para avaliar diferentes protocolos à base de progestágenos/progesterona mostraram que tratamentos longos para regressão espontânea do CL (≥ 14 d) foram eficientes em sincronizar o estro. No entanto, a utilização da progesterona por períodos maiores que 13 dias levam

à formação de folículos dominantes de maior tamanho (persistentes; CUSTER et al., 1994; KINDER et al., 1996) e de reduzida fertilidade. A baixa fertilidade é atribuída à maturação espontânea do oócito (quebra da vesícula germinativa e expansão do *cumulus*) presente no folículo persistente (REVAH & BUTLER, 1996).

Tratamentos que induzem à regressão do folículo persistente e levam à emergência de uma nova onda de crescimento folicular melhoraram as taxas de prenhez em programas de IA (MCDOWELL et al., 1998).

Inicialmente, o E2 foi utilizado em conjunto com a P4 com o intuito de induzir luteólise (WILTBANK et al., 1961). Durante a década de 1990, observou-se que os tratamentos com E2 inibiam o crescimento do folículo antral (BO et al., 1991). A administração de 5 mg de 17 β estradiol em associação com implantes de P4 sincronizam a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, em média, cerca de $4,3 \pm 0,2$ dias mais tarde (BO et al., 1995). Outros estudos avaliaram o efeito de diferentes ésteres de E2 na indução da emergência da onda folicular. O uso do valerato de E2 (VE; MAPLETOFT et al., 1999) ou do cipionato de E2 (ECP; THUNDATHIL et al., 1998) provoca a regressão folicular, mas a emergência da onda acontece de forma menos previsível, devido sua longa meia-vida, do que a determinada por fármacos de ação mais curta, como o 17 β -estradiol (BÓ et al., 1995) e o benzoato de estradiol (BE; CACCIA & BÓ, 1998). O BE, aplicado por via intramuscular em combinação com 50mg de P4 resultou na emergência de nova onda folicular em $4,1 \pm 0,1$ dias, com variação de 3,5 a 5 dias (MORENO et al., 2001).

Nos últimos anos tornaram-se disponíveis na América do Sul vários dispositivos intravaginais que liberam P4 (CIDR[®], DIB[®], PRID[®], Cronipress[®], Primer[®]). O uso destes dispositivos intravaginais liberadores de P4 associados à administração de BE é um dos tratamentos mais utilizados para a IATF de vacas (MACMILLAN & BURKE, 1996; BO et al., 2002, 2003). O tratamento mais conhecido consiste na administração de BE (2,0 mg, via IM) no momento da inserção do dispositivo (Dia 0), aplicação de PGF2 α no dia da remoção do dispositivo (Dia 8) e 1,0 mg de BE (via IM) 24 horas mais tarde. A IATF é realizada 30 a 36 horas após a última aplicação de BE. Portanto, neste

protocolo são utilizados os seguintes hormônios: progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno (protocolo PEPE; revisado por BARROS & ERENO, 2004). No entanto a utilização deste protocolo em novilhas Nelore, não apresenta bons resultados (BARUSELLI et. al., 2001).

Alguns estudos demonstram que altas concentrações de P4 circulantes diminuem a pulsatilidade do LH (BERGFELD et al., 1995; BURKE et al., 1996; CALEJAS et al., 2006), reduzem o crescimento do folículo dominante e a eficiência dos protocolos baseados na utilização da P4 (BARUSELLI et al 2001). Colazo et al. (2008) realizaram um experimento para averiguar a resposta do GnRH em induzir a liberação de LH sob altos níveis de P4, tanto em novilhas, quanto em vacas. Os autores observaram que níveis elevados de P4 plasmática reduzem a liberação de LH pela hipófise após a administração de GnRH tanto em novilhas quanto em vacas, de forma linear, não observando diferenças entre as duas categorias.

Mantovani et al. (2004) relataram que a utilização da PGF2 α no quinto dia, durante o tratamento com dispositivos contendo P4, em novilhas mestiças, foi efetiva em reduzir os níveis plasmáticos de P4, aumentar o crescimento do folículo dominante e a taxa de ovulação. Carvalho et al (2008) utilizaram o mesmo tratamento e observaram uma melhora nas taxas de ovulação no grupo que recebeu PGF2 α em relação ao controle [79,4% (27/34) vs 52,7% (19/36)]. No entanto, Marques et al. (2005) testaram a eficácia da aplicação da PGF2 α no dia da inserção do progestágeno em relação às taxas de prenhez em novilhas Nelore, ciclando ou pré-púberes, e não observaram diferenças [com PGF2 α : 25,8% (50/194) vs sem PGF2 α : 24,7% (49/198)].

2.2.3 GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)

Outro fármaco que poderia contribuir para aumentar o crescimento final do folículo pré ovulatório seria a gonadotrofina coriônica equina (eCG). A eCG é uma gonadotrofina glicoprotéica produzida pela placenta de equinos durante a gestação (COMBARNOUS, 1992). Quando administrada em outras espécies a eCG se liga aos receptores de FSH e de LH, sendo a única gonadotrofina capaz de se ligar simultaneamente a esses

dois receptores, exceto nos equinos (MURPHY & MARTINUK, 1991). Na égua o eCG estimula a formação das glândulas luteais acessórias para auxiliarem na manutenção da gestação (Ginther, 1996). Nos bovinos essa gonadotrofina apresenta longo tempo de ação, variando de 50 a 100 horas, devido à proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente na sua molécula (SCHAMS et al., 1978).

Sá Filho et al. (2004), utilizando vacas lactantes em anestro, verificaram que o uso da eCG em protocolos de IATF, após a retirada do implante auricular de progestágeno, não induziu aumento no diâmetro máximo do folículo ovulatório (eCG: $13,0 \pm 0,6$ vs não eCG: $12,8 \pm 0,8$ mm), embora apresentassem aumento nas taxas de ovulação [eCG: 71% (19/26) vs não eCG: 50% (14/24); $p < 0,05$]. Mesmo assim, outros trabalhos indicam que a adição de eCG (400 UI, IM) ao protocolo PEPE aumentou a taxa de prenhez em zebuínos [38,9% (42/108) vs 54,7% (58/106), $P < 0,05$; BARUSELLI et al., 2003] ou mestiços [*indicus* x *taurus*; 46,8% (44/96) vs 59,1% (58/98), $P < 0,05$; CUTAIA et al., 2003] principalmente se os animais se encontrarem em anestro pós-parto e com baixo escore corporal (≤ 2 , em uma escala de 0 a 5, revisado por BARUSELLI et al., 2004). Marques et al. (2003) reportaram que vacas tratadas com eCG no dia da remoção do dispositivo de P4, apresentaram uma melhora nos níveis circulantes de P4 12 dias após o fim do tratamento ($8,6 \pm 0,9$ vs $4,5 \pm 0,7$ ng/ml), o que poderia favorecer a manutenção da gestação.

Da mesma forma, novilhas nelores sincronizadas com o protocolo PEPE, associado ao eCG (400 UI, IM) apresentaram uma melhora nas taxas de prenhez [com eCG: 34,9% (68/195) vs sem eCG: 15,7% (31/197), $P < 0,05$; MARQUES et al., 2005].

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com diferentes níveis de progesterona plasmática no desenvolvimento folicular, nas taxas de ovulação e prenhez, utilizando no protocolo de sincronização do estro dispositivos intravaginais contendo 0,558 ou 1 g de progesterona associadas ou não á $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao início do tratamento. Além disso, determinar se a aplicação de 300 UI de eCG na retirada do dispositivo pode resultar em maior crescimento folicular e maiores taxas de ovulação e prenhez, apesar dos resultados não apresentarem ainda taxas satisfatórias.

3 – OBJETIVOS

Objetiva-se com o presente trabalho determinar se:

- 1) A utilização de dispositivos intravaginais contendo 0,558g de P4 e/ou a aplicação da PGF2 α no dia da inserção de dispositivo intravaginal no protocolo de sincronização do estro levam à redução dos níveis plasmáticos de progesterona durante o período de tratamento;
- 2) A redução dos níveis plasmáticos de P4 resulta em aumento do diâmetro do folículo dominante no dia 9 do protocolo de sincronização do estro;
- 3) O aumento do diâmetro do folículo dominante no D9 do protocolo de IATF resulta em maiores taxas de ovulação e prenhez.
- 4) A utilização do eCG aumenta o tamanho do folículo dominante, aumentando as taxas de ovulação e prenhez.

4 – HIPÓTESES A SEREM TESTADAS

- A utilização de dispositivo intravaginal contendo 0,558 g de P4 em comparação a dispositivo contendo 1 g de P4, resulta em menores níveis plasmáticos de P4 e contribui para o aumento do diâmetro do folículo dominante e maiores taxas de ovulação e prenhez.
- A administração de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal favorece o aumento do diâmetro do folículo dominante e resulta em maiores taxas de ovulação e prenhez.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – EXPERIMENTO 1

5.1.1 – Localização e animais

O experimento foi conduzido na Estância Rosalito (latitude 22° 55' S e longitude 49°40'O), localizada no município de Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo, durante o mês de março de 2006.

Inicialmente, foram utilizadas novilhas (n = 20) da raça Nelore, com 2 a 3 anos de idade, pesando $296,9 \pm 3,6$ kg (média $\pm$ EPM), com condição corporal de $2,8 \pm 0,02$ [média $\pm$ EPM; variando de 1 a 5 (LOWMAN 1976)], mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* e suplementadas com sal mineral e água a vontade. Os animais foram pesados individualmente no começo (D -17) e no final (D12) do experimento, sempre no início do período da manhã.

5.1.2 – Grupos Experimentais

Novilhas da raça Nelore (n = 20), com presença de corpo lúteo ao exame ultrassonográfico, foram pré sincronizadas, utilizando-se um dispositivo intravaginal contendo 1 g de progesterona (D -17) durante 9 dias (Cronipres[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina). No dia da retirada do dispositivo (D -9) os animais receberam 150 µg de d-cloprostenol (Croniben[®], Biogenesis, Buenos Aires, Argentina, via IM) e vinte e quatro horas depois (D -8) 1 mg de benzoato de estradiol (BE, Bioestrogen, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM). Os animais foram avaliados de 60 a 72 horas após a aplicação do BE para determinar a ovulação (Figura 1).

Em cinco animais os tratamentos não foram efetivos em sincronizar a onda de crescimento folicular (folículos menores que 5 mm no D8) sendo descartados na sequencia do experimento.

As novilhas que apresentaram ovulação (constatada pelo exame ultrassonográfico; n = 15) foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais.

Os animais dos grupos 0,5G (n = 4) e 1G (n = 4) receberam no D0 um dispositivo contendo 0,558g (TRIU-B[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via intravaginal) ou 1g de P4 (CRONIPRES[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via intravaginal) e também 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Bioestrogen[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM). Os animais dos grupos 0,5G/PGF (n = 4) e 1G/PGF (n = 3) receberam o mesmo tratamento dos grupos 0,5G e 1G, mais 75 µg de d-cloprostenol (Croniben[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM) no dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0).

5.1.3 Ultrassonografia e Dinâmica Folicular

Todos os animais foram monitorados diariamente do dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0) até 48 horas após sua retirada (D8) por ultrassonografia (Aloka SSD 900, transdutor de 9 MHz) transretal, realizadas pelo mesmo operador. Nos dias D11 e D12 os exames foram realizados a cada 12 horas.

O transdutor de ultrassom foi movimentado sobre a superfície dos ovários e, quando necessário, a imagem do monitor foi “congelada” para mensuração do tamanho dos folículos (≥ 2 mm). Duas imagens diferentes de cada folículo foram obtidas e mensuradas. Quando se observou acentuada diferença entre as mensurações, obteve-se uma terceira imagem para confirmar o tamanho correto do folículo. Após cada exame, foram desenhados diagramas da posição dos folículos em relação a outras estruturas ovarianas, de forma a permitir a identificação de cada folículo durante dias sucessivos.

O momento do início da onda de crescimento folicular foi determinado pelo aparecimento de um grupo de folículos maiores de 2 mm. A taxa de crescimento (mm/dia) foi calculada pela diferença entre o diâmetro

mínimo e o diâmetro máximo, dividida pelo período de crescimento (FIGUEIREDO et al., 1997; CARVALHO et al., 2008).

Considerou-se como o momento da ovulação a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira ocasião em que o mesmo não foi detectado no monitor do ultrassom.

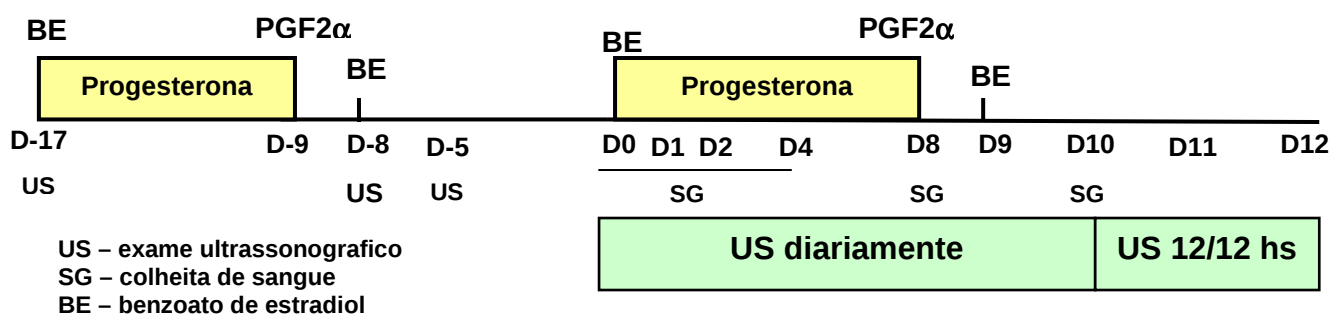


Figura 1. Protocolo para pré-sincronização (D -17 a D -5) e sincronização (D 0 a D 12) do ciclo estral de novilhas Nelores cíclicas utilizando dispositivo intravaginal contendo 1 ou 0,558 g de progesterona, associadas ou não a aplicação de 150 μ g de PGF2 α no D0. O crescimento folicular foi acompanhado por meio de exames de ultrassonografia realizados diariamente entre os dias 0 e 8, e a cada 12 horas entre os dias 9 e 12.

5.1.3 – Coleta de sangue e radioimunoensaio da progesterona

Foram realizadas coletas de sangue através de venopunção da veia coccígea em tubos heparinizados (BD Vacutainer®, New Jersey, USA; 10 mL) nos dias 0, 1, 2, 4, 8 e 10 do tratamento (Figura 1). Após a colheita as amostras foram mantidas em recipientes com gelo por no máximo 5 horas. As amostras foram centrifugadas a 1600 xg por 20 minutos e armazenadas a -20°C, para posterior dosagem de progesterona. As concentrações plasmáticas de P4 foram determinadas, em um único ensaio, com “Kit” da DSL Progesterona (DSL 32400, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA). O coeficiente de variação intraensaio foi de 1,49%.

5.1.4 – Análise estatística

As variáveis peso dos animais ao início e ao final do experimento, início da onda de crescimento folicular, número de folículos recrutados, diâmetro folicular no D8 e D9, diâmetro máximo do folículo dominante e taxa de crescimento do folículo dominante foram comparadas por análise de variância através do programa PROC GLM (SAS 9.1, 2002). Para análise dos níveis plasmáticos de progesterona foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas, através do programa PROC GENMOD do SAS 9.1 (2002), verificando efeito principal da aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no D0, uso de dispositivos intravaginais com diferentes concentrações de P4 (0,558 vs 1g), tempo e suas interações.

5.2 - EXPERIMENTO 2

5.2.1 Localização e animais

O experimento foi conduzido na Fazenda Cristal (latitude 22°31' S; longitude 50°04' O), localizada no município de Campos Novos Paulista, estado de São Paulo, e na Fazenda Pontal (latitude 14°27' S; Longitude 51°43' O), localizada no município de Nova Xavantina, estado de Mato Grosso, durante os meses de novembro e dezembro de 2006. Foram utilizadas novilhas (n = 292) da raça Nelore, com dois a três anos de idade, pesando entre 270 e 430 kg, com condição corporal de $2,8 \pm 0,02$ (média $\pm$ EPM; variando de 1 a 5; Lowman et al., 1976), mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementadas com sal mineral e água a vontade.

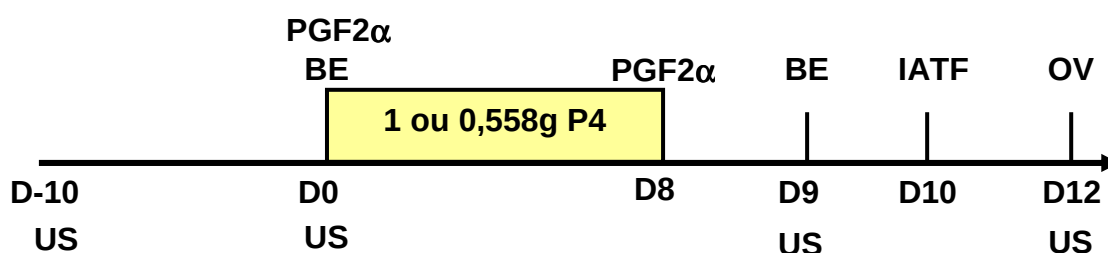
5.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram previamente submetidos a dois exames ultrassonográficos dos ovários, com 10 dias de intervalo, a fim de determinar a presença de CL. Somente as novilhas com CL em pelo menos uma das ultrassonografias foram utilizadas no experimento. Estas novilhas foram distribuídas ao acaso em quatro grupos experimentais contendo 1g (grupo 1G) ou 0,558g (grupo 0,5G) de P₄, associadas (com PGF) ou não (sem PGF) à aplicação de PGF2 α no dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0).

No momento da introdução do dispositivo foi determinada a condição corporal de todos os animais e 22 animais foram pesados.

As novilhas dos Grupos 0,5G (n = 76) e 1G (n = 70) receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (Triu B[®]; Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, 0,558g P₄ ou Cronipres[®]; Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, 1g P₄) no D0, respectivamente e benzoato de estradiol (Bioestrogen[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, 2mg, via IM). Nove

dias mais tarde (D8) foi administrada 150µg de d-cloprostenol (Croniben®, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM), e o dispositivo intravaginal foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do dispositivo as novilhas foram tratadas com BE (1,0 mg, via IM) e 30-36 h depois os animais foram inseminados artificialmente (IATF) sem observação de cio (Figura 2).



US: exame ultra-sonográfico dos ovários

OV: ovulação

Figura 2. Protocolo para sincronização da ovulação de novilhas Nelores cíclicas utilizando dispositivos intravaginais contendo 1 (grupo 1G) ou 0,558g (grupo 0,5G) de progesterona, associadas (grupos 1G/PGF e 0,5G/PGF) ou não a PGF2α no início do tratamento (D0)

Os animais dos grupos 0,5G/PGF (n = 75) e 1G/PGF (n = 71) foram tratados de forma similar aos grupos 0,5G e 1G, respectivamente, exceto que receberam 2 doses de PGF2α (150µg d-cloprostenol; via IM; no D0 e D8).

5.2.3 – Touros e inseminadores

Foram utilizadas doses de sêmen comerciais de 12 touros, previamente analisadas e aprovadas quanto às características de motilidade e vigor. As doses de sêmen utilizadas foram distribuídas proporcionalmente entre os grupos tratados.

A maioria das inseminações foi realizada por um único inseminador experiente, as demais foram realizadas por outros dois

inseminadores, também bastante experientes, distribuídas proporcionalmente entre os grupos.

5.2.4 – Ultrassonografia

Após a última aplicação de BE (D 9) foi realizado o exame ultrassonográfico (Aloka SSD 500, transdutor de 5,0 MHz) em aproximadamente metade dos animais de cada grupo [0,5G (n = 28); 1G (n = 35); 0,5G/PGF (n = 34); 1G/PGF (n = 31)] para identificação do FD. As novilhas que não apresentaram folículos maiores que 5 mm no dia da ultrassonografia (D9) foram considerados como não sincronizados. Portanto, a taxa de sincronização foi determinada pela razão entre o número de animais com FD no D9 maiores que 5 mm e o total de animais tratados.

No décimo segundo dia, 72 horas após a aplicação da segunda dose do BE, foi realizado novo exame ultrassonográfico para determinar a taxa de ovulação dos folículos detectados no D9.

O Diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico cerca de 35 dias após a IATF.

5.2.5 – Análise Estatística

As variáveis taxas de sincronização do folículo dominante, ovulação e prenhez foram analisadas por regressão logística, através do programa PROC GENMOD (SAS 9.1, 2002). Para as análises de taxas de prenhez foram consideradas no modelo o efeito do tipo de dispositivo intravaginal, aplicação ou não da PGF no D0, fazenda, inseminador, touro, ECC e interações.

5.3 – EXPERIMENTO 3

5.3.1 – Animais e localização

O experimento 3 foi conduzido durante a estação reprodutiva de novembro 2007 a maio de 2008, nas mesmas fazendas do experimento 2. Foram utilizadas novilhas Nelores ($n = 459$), com idade entre 2 e 3 anos e condição corporal de $2,8 \pm 0,01$ [média $\pm$ EPM; escore de condição corporal variando de 1 a 5 (Lowman et al., 1976)].

5.3.2 Grupos experimentais

As novilhas foram distribuídas ao acaso em quatro grupos experimentais. Dois grupos idênticos aos do experimento 2 [grupos 0,5G/PGF ($n=109$) e 1G/PGF ($n=119$)] e dois novos grupos (0,5G/PGF/eCG e 1G/PGF/eCG) semelhantes aos primeiros, exceto que os animais receberam 300 UI de eCG (Novormon, Shering-Plough, New Jersey, USA; via IM) no momento da retirada do dispositivo intravaginal (D8).

5.3.3 – Colheita de sangue e radioimunoensaio de P4

Foram selecionados aleatoriamente alguns animais de cada grupo [0,5G/PGF ($n = 38$); 1G/PGF ($n = 47$); 0,5G/PGF/eCG ($n = 39$) e 1G/PGF/eCG ($n = 43$)] para colheita das amostras. Após a colheita, as amostras (10 mL) foram imediatamente centrifugadas a 1600 xg por 20 minutos e o plasma obtido armazenado a -20°C , até o momento da análise por meio de técnica de radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Knickerbocker et al. (1986), modificadas por Carriere e Lee (1994). Os coeficientes de variação intra e interensaios foram de 4,56% e 11,48%, respectivamente.

5.3.4 – Ultrassonografia

Os exames ultrassonográficos dos animais foram realizados de forma semelhante ao segundo experimento. Além disso, no momento da aplicação do BE (D9) foram realizadas medidas do diâmetro do folículo dominante de um grupo de novilhas [0,5G/PGF (n= 48); 1G/PGF (n = 41); 0,5G/PGF/eCG (n = 51); 1G/PGF/eCG (n = 55)].

O diagnóstico de gestação foi realizado por exame de ultrassonografia cerca de 35 dias após a IATF.

5.3.5 – Touros e inseminadores

Foram utilizadas doses de sêmen comerciais previamente analisadas quanto às características de motilidade e vigor, de oito touros, sendo seis da raça Nelore e dois Brangus. As doses de sêmen foram distribuídas proporcionalmente entre os grupos tratados.

Todas as inseminações foram realizadas por um único inseminador experiente.

5.3.6 – Análise estatística

As variáveis taxas de sincronização do folículo dominante, ovulação e prenhez foram analisadas por regressão logística, através do programa PROC GENMOD do SAS 9.1 (2002). Para as análises de taxas de ovulação e prenhez foram considerados no modelo o efeito da quantidade de progesterona no dispositivo intravaginal, utilização de 300UI de eCG no dia 8 do protocolo, fazenda, touro, ECC e suas interações.

As medidas do diâmetro folicular no D9 e concentração plasmática de P4 no D0 e D8 foram comparadas por análise de variância através do programa PROC-GLM do SAS 9.1 (2002).

6 – RESULTADOS

6.1 – Experimento 1

Em todos os grupos houve uma significativa perda de peso das novilhas ao final do experimento, devido principalmente ao manejo intenso a que foram submetidas (tabela 1).

Não houve diferença significativa no intervalo entre a inserção do dispositivo intravaginal de P4 (D0) e a emergência da nova onda de crescimento folicular, assim como o número de folículos recrutados (>2 mm) entre os grupos 0,5G e 1G, com ou sem PGF2 α (tabela 2).

Tabela 1. Peso (média $\pm$ EPM) de novilhas Nelore, ao início (D0) e ao final do experimento (D12), tratadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g (grupo 1G) de progesterona e suas associações com PGF2 α (grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF) submetidas a exames diários de ultrassonografia transretal.

Tratamentos	N	Peso (kg)		Valor de P
		inicial	final	
0,5G	4	307 $\pm$ 12,5	288 $\pm$ 10,9	0,001
1G	4	342 $\pm$ 21,9	329 $\pm$ 24,8	0,01
0,5G/PGF	4	325 $\pm$ 10,2	311 $\pm$ 11,7	0,009
1G/PGF	3	318 $\pm$ 6,5	307 $\pm$ 10,1	0,03

As novilhas do grupo 0,5G apresentaram taxa de ovulação de 50% (n=4/8), e não diferiram daquelas do grupo 1G, que apresentaram taxa de ovulação de 43% (n=3/7). Os animais que não receberam a PGF2 α no D0 apresentaram maiores taxas de ovulação (63%; n=5/8) do que aqueles que receberam a PGF2 α no início do tratamento (22%; n=2/7).

Tabela 2. Efeito do nível de progesterona do dispositivo intravaginal (0,558g ou 1g) e da PGF2 α nos parâmetros de recrutamento e crescimento folicular em novilhas Nellores tratadas para sincronização da ovulação.

grupos	Tratamento	Início da onda (dias)	N folículos recrutados (> 2 mm)	Ø FD no D8 (mm)	Ø FD no D9 (mm)	Ø máximo do FD (mm)	Taxa de crescimento (mm/dia)
0,5G	Sem PGF (n = 4)	2,8 $\pm$ 0,1	32,0 $\pm$ 1,3	7,0 $\pm$ 0,4	7,9 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,2	0,78 $\pm$ 0,06
	Com PGF (n = 4)	3,0 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 2,3	6,6 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,2	0,69 $\pm$ 0,06
1G	Sem PGF (n = 4)	3,2 $\pm$ 0,2	21,5 $\pm$ 2,6	6,8 $\pm$ 1,3	7,0 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 1,1	0,56 $\pm$ 0,29
	Com PGF (n = 3)	2,3 $\pm$ 0,5	22,0 $\pm$ 2,1	6,7 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 1,5	8,4 $\pm$ 0,3	0,64 $\pm$ 0,10
EFEITOS PRINCIPAIS							
0,5G	(n = 8)	2,7 $\pm$ 0,2	28,3 $\pm$ 2,1	6,8 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,05
1G	(n = 7)	2,9 $\pm$ 0,3	21,7 $\pm$ 1,8	6,8 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 10,2	0,62 $\pm$ 0,09
Sem PGF	(n = 8)	2,9 $\pm$ 0,1	26,8 $\pm$ 2,4	6,9 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,5	0,63 $\pm$ 0,06
Com PGF	(n = 7)	2,7 $\pm$ 0,3	23,4 $\pm$ 1,8	6,7 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,05

Não houve diferença significativa $P > 0,1$

N folículos recrutados: número de folículos recrutados

ØFD: diâmetro do folículo dominante

No início do experimento (D0) os níveis circulantes de P4 não foram significativamente diferentes, variando de 5,8 a 7,5 ng/ml. Cerca de 24 horas após a inserção do dispositivo houve uma elevação nos níveis plasmáticos P4 em todos os grupos. No D1 o grupo 0,5G/PGF apresentou o menor valor de progesterona e foi significativamente menor que os outros grupos ($P = 0,01$). Nos dias D2 e D4 não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,06$ e $0,07$, respectivamente), mas no dia da retirada do dispositivo intravaginal (D8) os níveis circulantes de P4 foram maiores nos animais do grupo 1G ($P = 0,004$). No D10 não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,07$).

Levando-se em consideração o período de efeito dos tratamentos (D1 a D8), de modo geral, os níveis circulantes de progesterona foram mais altos para os animais do grupo 1G e mais baixos para aqueles do grupo 0,5G/PGF. Os animais dos demais tratamentos (0,5G; 1G/PGF) apresentaram níveis circulantes de P4 intermediários (Figura 3).

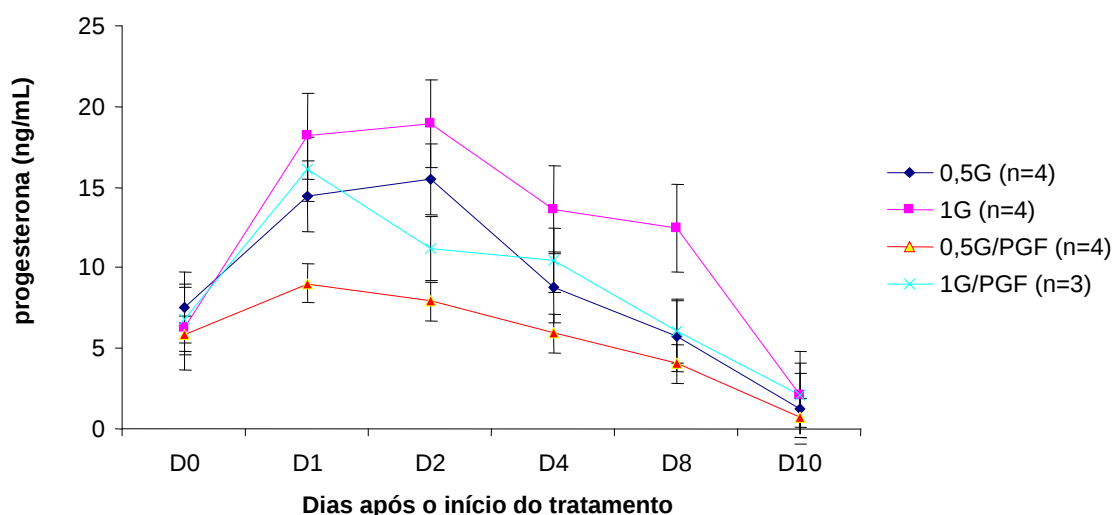
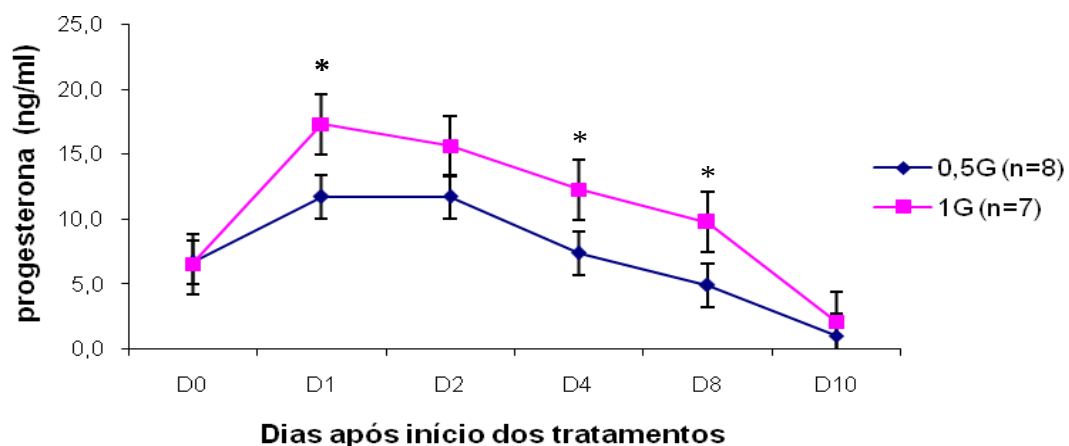


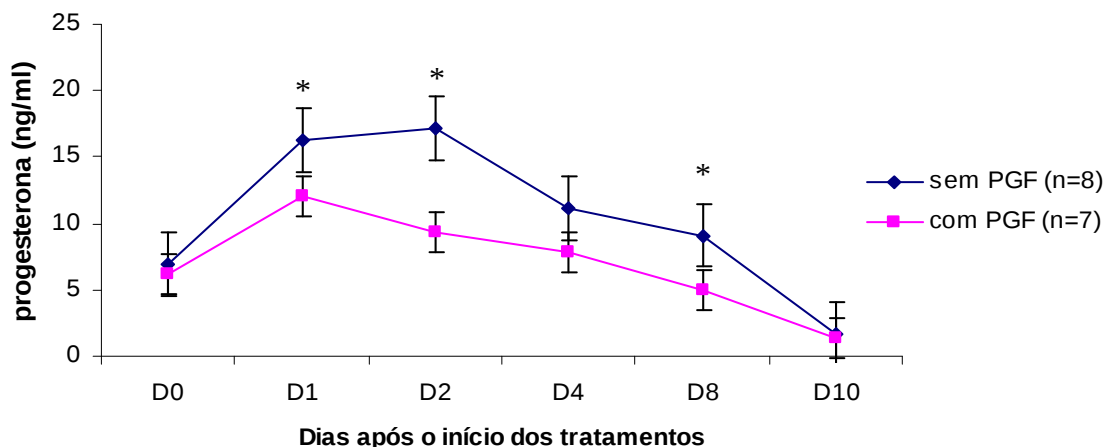
Figura 3. Concentração plasmática de progesterona em novilhas Nelores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g de P4 (grupo 1G) associadas (0,5G/PGF; 1G/PGF) ou não à PGF2 α no D0.

Comparando o efeito principal de dispositivo (0,558g vs 1g), os níveis plasmáticos de P4 nos dias D1, D4, D8 e D10 foram maiores nas novilhas do grupo 1G, do que naquelas do grupo 0,5G (Figura 4). Da mesma forma os animais tratados com PGF2 α no D0 apresentaram menores níveis circulantes de P4 nos dias D1, D2 e D8 (Figura 5).



*Diferença significativa, $P < 0,05$

Figura 4. Níveis plasmáticos de progesterona em novilhas Nellores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558 g (grupo 0,5G) ou 1 g (grupo 1G) de P4.



*Diferença significativa, $P < 0,05$

Figura 5. Níveis plasmáticos de progesterona em novilhas Nellores tratadas (com PGF) ou não (sem PGF) com 150 μ g de PGF2 α (d-cloprostenol) no D0.

6.2 – Experimento 2

Os resultados apresentados entre as duas Fazendas onde foram realizados os experimentos não foram significativamente diferentes ($P = 0,26$). Não houve efeito significativo de touros ($P = 0,91$) e inseminadores ($P = 0,86$) dentro de cada fazenda. Assim sendo, os resultados obtidos nas duas fazendas foram agrupados.

Os tratamentos foram efetivos em sincronizar o ciclo estral dos animais, originando taxas de ovulações superiores a 65%.

A utilização da $\text{PGF2}\alpha$ no início do protocolo (D0) não interferiu nas taxas de ovulação ou prenhez em relação aos animais dos grupos sem $\text{PGF2}\alpha$ ($P = 0,74$; Tabela 3)

Tabela 3. Taxas de sincronização do folículo dominante (animais com folículos > 5mm no D9/ total de animais tratados), ovulação e prenhez em novilhas Nelores sincronizadas com diferentes níveis de progesterona, associadas (0,5G/PGF; 1G/PGF) ou não (0,5G; 1G) à $\text{PGF2}\alpha$ no dia da inserção do dispositivo intravaginal.

Tratamentos	SINCRONIZAÇÃO DA ONDA (%)	OVULAÇÃO (%)	PRENHEZ (%)
0,5G	28/25 (89,3)	28/19 (67,8)	76/23 (30,2)
1G	35/33 (94,3)	35/27 (77,1)	70/18 (25,7)
0,5G/PGF	34/34 (100)	34/26 (76,5)	75/25 (33,3)
1G/PGF	31/26 (83,9)	31/20 (64,5)	71/20 (28,2)
Efeitos principais			
0,5G	62/59 (95,2)	62/45 (72,6)	151/48 (31,8)
1G	66/59 (89,4)	66/47 (71,2)	141/38 (26,9)
Com PGF	65/60 (92,3)	65/46 (70,7)	146/45 (30,8)
Sem PGF	63/58 (92,1)	63/46 (73)	146/41 (28)

*não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

6.3 – Experimento 3

As taxas prenhez apresentadas nas fazendas onde foram realizados os experimentos não foram significativamente diferentes ($P = 0,69$). Do mesmo modo, não houve efeito significativo de touros ($P > 0,3$).

Todos os tratamentos foram eficientes em sincronizar o crescimento folicular, resultando em taxas de ovulação de 60 a 70% (tabela 4).

A utilização de dispositivos intravaginais contendo menores níveis de P4 (0,558g) resultou no D9 em folículos dominantes de maior diâmetro ($P < 0,01$). No entanto, a utilização de dispositivo intravaginal contendo 0,558 g não afetou significativamente as taxas de ovulação ($P = 0,42$) e de prenhez ($P = 0,45$; Tabela 4).

O emprego da eCG no momento da retirada do dispositivo não influenciou o tamanho do folículo dominante no D9 ($P = 0,78$), assim como as taxas de ovulação ($P = 0,79$) ou prenhez ($P = 0,49$; Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de sincronização do folículo dominante (folículos > 5mm no D9/ total de animais tratados), diâmetro folicular (média $\pm$ EPM) no D9 e taxas ovulação e prenhez, em novilhas Nelores cíclicas sincronizadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1g (grupo 1G) de progesterona e com PGF2 α no D0, associadas (0,5G/PGF/eCG; 1G/PGF/eCG) ou não (0,5G/PGF; 1G/PGF) a 300 UI de eCG na retirada do dispositivo (D8).

TRATAMENTOS	SINCRONIZAÇÃO DA ONDA (%)	Ø FD $\pm$ EPM no D9	OVULAÇÃO (%)	PRENHEZ (%)
0,5G/PGF	38/34 (89,5)	10,3 $\pm$ 0,35 mm (n = 48)	38/27 (71)	109/42 (38,5)
1G/PGF	47/37 (78,7)	9,3 $\pm$ 0,34 mm (n = 50)	47/30 (63,8)	119/47 (39,5)
0,5G/PGF/eCG	39/38 (97,4)	10,2 $\pm$ 0,29 mm (n = 51)	39/30 (76,9)	115/50 (43,4)
1G/PGF/eCG	43/40 (93)	9,4 $\pm$ 0,29 mm (n = 55)	43/28 (65,1)	116/46 (39,6)
EFEITOS PRINCIPAIS				
0,5G	77/72 (93,5)	10,3 $\pm$ 0,22* mm (n = 99)	77/57 (74)	224/92 (41)
1G	90/77 (85,5)	9,3 $\pm$ 0,21* mm (n = 105)	90/58 (64,4)	235/93 (39,5)
0 UI eCG	85/71 (83,5)	9,8 $\pm$ 0,24 mm (n = 98)	85/57 (67)	228/89 (39)
300 UI eCG	82/78 (95,1)	9,7 $\pm$ 0,2 mm (n = 106)	82/58 (70,7)	231/96 (41,5)

*Diferença significativa entre os diâmetros foliculares dos grupos 0,5G e 1G (P<0,01)

Ø FD: diâmetro do folículo dominante

As taxas de ovulação e prenhez aumentaram, de acordo com o aumento do folículo dominante no D9 (Figura 6; P<0,01) do protocolo de sincronização do ciclo estral.

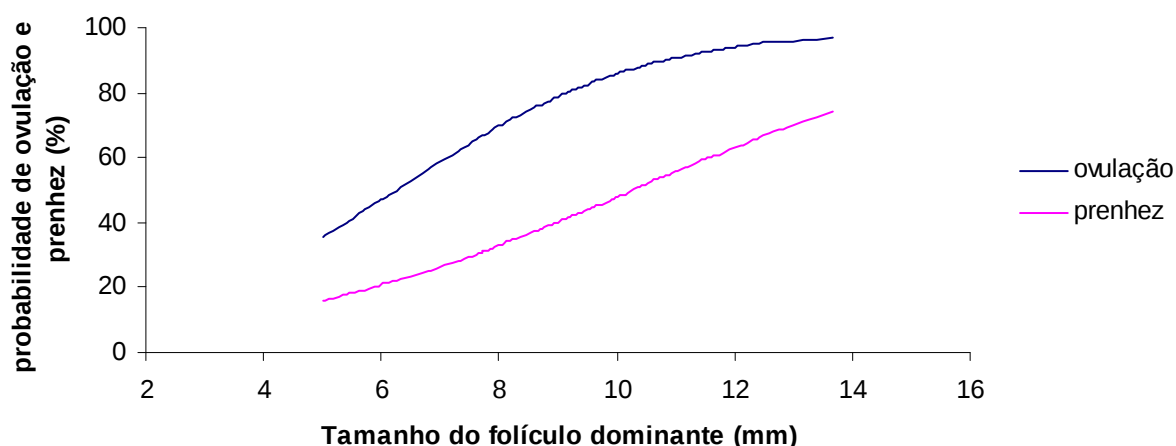
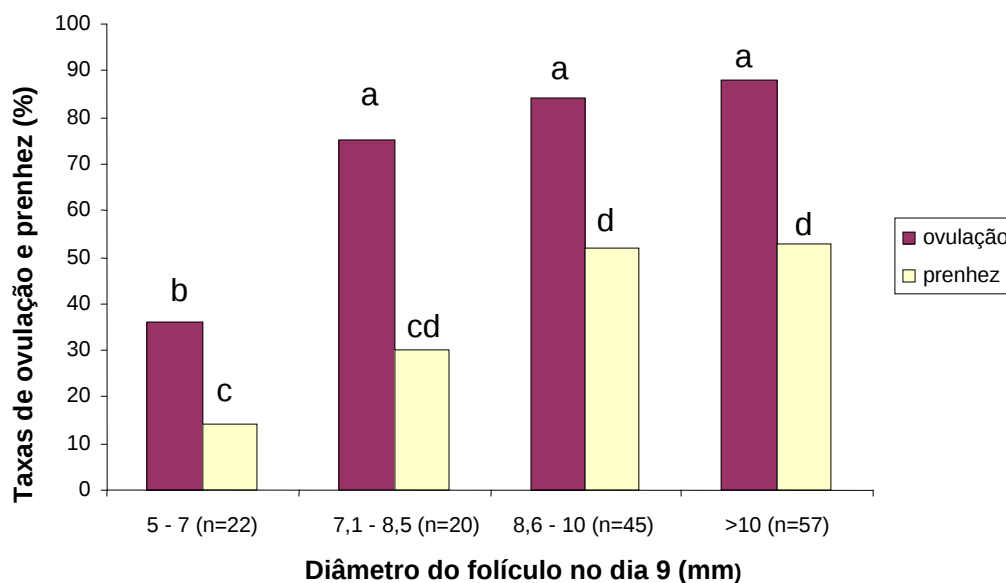


Figura 6. Probabilidades de ovulação e de prenhez em novilhas Nelores cíclicas de acordo com o diâmetro do folículo dominante, determinadas no dia 9 do protocolo de sincronização da ovulação, utilizando benzoato de estradiol (2mg, IM) e dispositivo intravaginal de progesterona durante 9 dias, 150 µg de d-croplostenol no dia da retirada do dispositivo e benzoato de estradiol vinte e quatro horas mais tarde (n = 143).

As taxas de ovulação aumentaram significativamente em folículos maiores de 7,1 mm (mensurados no D9; Figura 7). No entanto, as taxas de prenhez foram significativamente maiores quando os folículos se encontravam maiores que 8,6 mm, no D9. Folículos com diâmetros menores que 7 mm (mensurados no D9) apresentaram taxas de prenhez ao redor de 13% (Figura 7).



Letras diferentes indicam diferença significativa, $P < 0,05$

Figura 7. Taxas de ovulação e de prenhez em novilhas Nelores cíclicas de acordo com o diâmetro do folículo dominante, determinadas no dia 9 do protocolo de sincronização da ovulação, utilizando benzoato de estradiol (2mg, IM) e dispositivo intravaginal de progesterona durante 9 dias, 150 µg de d-croptostenol no dia da retirada do dispositivo e benzoato de estradiol (1 mg, IM) vinte e quatro horas mais tarde (n = 143).

Embora não haja diferença significativa, 21% (16/76) dos animais tratados com dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 apresentaram diâmetro folicular entre 5 a 7 mm (mensurado no D9) contra apenas 9% (6/67) dos animais tratados com dispositivos contendo 0,558 g de P4 (Figura 8). Além disso, 45% (30/67) dos animais tratados com dispositivo intravaginal contendo 0,558g de P4, apresentaram no D9 do protocolo de sincronização do estro folículos com diâmetro maiores que 10 mm. Nos animais do grupo tratado com dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4, 36% (27/76) apresentaram (no D9) folículos maiores de 10 mm (Figura 8).

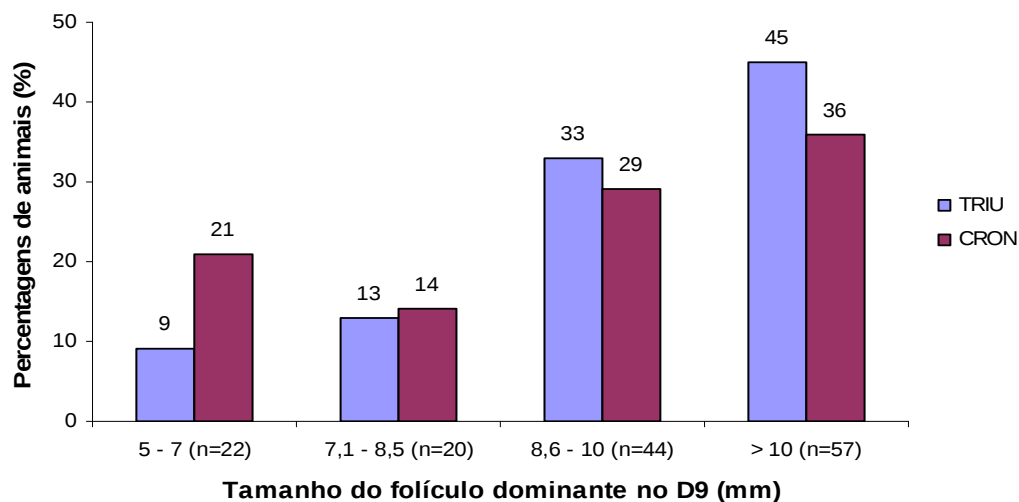


Figura 8. Percentagem de novilhas Nelores tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558g (n = 67) ou 1g (n = 76) de P4 que apresentaram no dia 9 do protocolo de sincronização do estro, diâmetros de 5 a 7; 7,1 a 8,5; 8,6 a 10 e >10 mm.

No terceiro experimento, os animais tratados com dispositivo intravaginal contendo 0,558 ou 1 g de P4 apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona semelhantes tanto no D0 ($P = 0,94$) quanto no D8 ($P = 0,69$; Tabela 5).

Tabela 5. Concentração plasmática de progesterona (média $\pm$ EPM) no início (D0) e no dia da retirada do dispositivo intravaginal (D8) em novilhas Nelores cíclicas tratadas com dispositivo intravaginal contendo 0,558 (grupo 0,5G) ou 1 g (grupo 1G) de P4 associados à PGF2 no D0.

Progesterona plasmática (ng/mL)		
Grupo	D0	D8
0,5G	3,92 $\pm$ 0,54 (n = 24)	4,39 $\pm$ 0,35 (n = 43)
1G	3,86 $\pm$ 0,47 (n = 30)	4,58 $\pm$ 0,30 (n = 54)

7 – DISCUSSÃO

No presente estudo a utilização de dispositivos intravaginais contendo diferentes níveis de progesterona (0,558g vs 1,0g) e a aplicação da PGF2 α no início do protocolo (D0) alteraram os níveis circulantes de progesterona (exp.1). Porém, estes tratamentos, assim como a utilização de 300 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal não alteraram significativamente as taxas de sincronização do ciclo estral, ovulação e prenhez, contrariando a hipótese inicial deste trabalho. Por outro lado, a utilização de dispositivos contendo menores concentrações de progesterona (0,5 grama) promoveu aumento significativo do diâmetro do folículo dominante no D9 do protocolo de IATF (exp. 3).

Embora os níveis de P4 tenham variado conforme as concentrações de P4 dos dispositivos ou ainda à aplicação ou não de PGF2 α no início do protocolo de sincronização do estro, o tamanho dos folículos dominantes no D8 e D9 não se alterou de forma significativa. Estes resultados estão em desacordo com outros trabalhos, que indicam uma relação inversa entre os níveis circulantes de P4 e o tamanho do folículo dominante (CALLEJAS et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; PERES 2008). O crescimento do folículo dominante (0,56 a 0,78 mm/dia) foi menor do que o relatado por outros autores (0,9 a 1,4 mm/dia; SARTORELLI et al. 2005; CASTILHO et al., 2007; ERENO, 2008). É possível que o estresse induzido pelo intenso manejo e indicado pela significativa perda de peso dos animais, tenha influenciado negativamente a pulsatilidade do LH, reduzindo o crescimento dos folículos dominantes e, portanto, prejudicando um possível efeito positivo da redução dos níveis de progesterona no desenvolvimento folicular.

Tanto no segundo quanto no terceiro experimentos, a utilização de dispositivos com diferentes doses de progesterona não influenciou de modo significativo às taxas de ovulação ou prenhez. Resultados semelhantes foram observados por Peres (2008) em novilhas tratadas com dispositivos intravaginais de 1° ou 3° uso (CIDR®). No entanto, Dias (2007), do mesmo

grupo de pesquisa, ao comparar as taxas de prenhez em novilhas cíclicas tratadas com dispositivos intravaginais de 1º, 2º ou 3º uso (CIDR®) observou melhora significativa dos resultados. As taxas de prenhez observadas por Peres (2008), assim como as do presente estudo, foram mais altas que as relatadas por Dias (2007), o que pode ter minimizado um possível efeito positivo do uso de dispositivos contendo menos progesterona.

É interessante notar no presente estudo que, no experimento 2, as taxas de ovulação e prenhez foram mais baixas do que no experimento 3 e o uso do dispositivo contendo menos progesterona aumentou, embora não significativamente, as taxas de prenhez. No entanto, no ano seguinte, quando houve uma melhora geral nas taxas de prenhez (exp. 3), este efeito não foi detectado. Embora os dois experimentos tenham sido realizados em condições semelhantes (fazenda, manejo dos animais, inseminadores, condição corporal) é possível que a condição de maturidade sexual tenha sido diferente. O experimento 2 foi realizado no início da estação de monta (novembro e dezembro), enquanto que o terceiro experimento se estendeu de novembro a maio. Byerley et al. (1987) relataram que novilhas cobertas no primeiro cio após a puberdade apresentaram menores taxas de concepção quando comparadas com aquelas cobertas ao terceiro cio. Segundo estes autores a fertilidade de novilhas cíclicas tende a aumentar conforme o número de ciclos estrais que elas apresentam quando colocadas em reprodução. Foi relatado que o tamanho e peso do útero, cérvix e vagina aumentam rapidamente após a puberdade e que tal fato pode estar ligado à estimulação exercida pelo aumento nas concentrações de estradiol e progesterona durante a fase pós-púbere, sendo um importante indicador de maturidade sexual (HONARAMOOZ et al., 2004; DESJARDINS & HAFS, 1969). Além disso, novilhas cíclicas (com presença de corpo lúteo) apresentaram maior diâmetro uterino em relação às novilhas pré-púberes (Sá FILHO et al., 2008, comunicação pessoal).

No primeiro experimento a aplicação de PGF2 α reduziu os níveis circulantes de progesterona nos dias 1, 2 e 8 após o início dos tratamentos. Estes resultados eram esperados, devido ao efeito luteolítico da PGF2 α , e foram semelhantes aos observados por CARVALHO et al. (2008) nos dias 3, 6

e 8 após a utilização do agente luteolítico, em protocolo hormonal semelhante ao do presente trabalho.

A utilização da $\text{PGF2}\alpha$ no início do protocolo PEPE não resultou em aumento significativo nas taxas de ovulação e prenhez corroborando os resultados apresentados por Marques et al. (2005), em novilhas da raça Nelore tratadas com protocolos similares aos dos experimentos 2 e 3. Por outro lado, Carvalho et al. (2008), ao utilizarem novilhas cíclicas e pré-sincronizadas observaram que os animais tratados com $\text{PGF2}\alpha$ apresentaram aumento no tamanho dos folículos dominantes nos dias 8 e 9 e maiores taxas de ovulações.

É interessante notar que a principal diferença entre os experimentos acima citados é que Carvalho et al. (2008) utilizaram novilhas pré-sincronizadas enquanto que nos outros trabalhos as novilhas se encontravam em dias aleatórios do ciclo estral. A resposta à aplicação da $\text{PGF2}\alpha$ em dia aleatórios do ciclo pode ser bastante variável. Vacas no início do ciclo (1° ao 5° dia) apresentam pouca ou nenhuma resposta à $\text{PGF2}\alpha$ e seus análogos (LAUDERDALE, 1972), mas a regressão do corpo lúteo pode ser de até 100% quando a $\text{PGF2}\alpha$ é aplicada no dia 7 do protocolo Ovsynch em vacas leiteiras (VASCONCELOS et al., 2000) ou em vacas Nelore sincronizadas com benzoato de estadiol e progesterona (LOSI et al., 2004). Para evitar a fase refratária do corpo lúteo, Peres (2008) adiou a aplicação da $\text{PGF2}\alpha$ para o dia 7 do protocolo PEPE em vacas solteiras e observou melhora significativa no tamanho do folículo ovulatório no D11 ($11,54 \pm 0,21$ vs $10,84 \pm 0,21$ mm) e nas taxas de prenhez (52 vs 36,4%). Portanto, a variação da resposta à aplicação da $\text{PGF2}\alpha$ pode explicar, ao menos em parte, os resultados acima.

A relação positiva entre o diâmetro folicular e a taxa de ovulação já é bastante conhecida e foi descrita por diversos autores, em novilhas Neloeres (GIMENES et al., 2008; CARVALHO et al, 2008; CASTILHO et al., 2007). No presente estudo observou-se correlação entre o tamanho do folículo e as taxas de ovulação e de prenhez, corroborando com os resultados da literatura. No entanto, a ovulação de folículos com até 8 mm de diâmetro (mensurados no D9), resultaram em baixas taxas de prenhez (ao redor de

14%). Uma possível explicação para este resultado seria a ocorrência de luteólise prematura (BRIDGES et al., 2004). Pequenos folículos tendem a formar CL pequenos com baixa capacidade de produzir progesterona, sendo incapazes de bloquear a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio (VASCONCELOS et al., 2001). Por outro lado, Peres (2008) observou que novilhas que ovularam folículos menores que 10 mm (mensurados no dia da IATF) e manifestaram cio, apresentaram maior taxa de concepção quando comparadas àquelas que não demonstraram estro. Este resultado indica que a capacidade desses folículos em produzir estradiol também pode ser um fator importante em estimar a fertilidade subsequente (MUSSARD et al., 2002). Em protocolos de IATF a indução de ovulação de folículos imaturos é indesejada, uma vez que alterações no ambiente uterino, causadas pela baixa exposição ao estradiol pré-ovulatório, podem ser responsáveis por menores taxas de concepção (PERRY et al., 2007).

Existem trabalhos (PEREZ 2008; BARUSELLI et al., 2004) que relatam um efeito positivo da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) em aumentar o tamanho folículo ovulatório, melhorando as taxas de ovulação e prenhez. A capacidade da eCG em se ligar a receptores de LH e FSH pode ser o mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro folicular e da taxa de sincronização (MURPHY et al., 1991). No presente estudo a aplicação de 300 UI de eCG não influenciou significativamente as taxas de prenhez (39,0 vs 41,5%), contrastando com os dados de Marques et al. (2005), que avaliaram o efeito da administração de $\text{PGF2}\alpha$ no D0 e da eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (CIDR[®], D8) em novilhas Nelore. Os animais que receberam eCG (400 UI, IM) apresentaram maiores taxas de prenhez (15,7 vs 34,9%). O efeito positivo do eCG, no estudo realizado por Marques et al. (2005), pode ter sido favorecido pelas baixas taxas de prenhez observadas nos animais do grupo controle (15,7%). Da mesma forma, Peres (2008) trabalhando com elevado número de novilhas Nelore (n = 1153) observou significativo aumento na taxa de prenhez dos animais tratados com eCG (47%) quando comparados a aqueles que receberam esta gonadotrofina (41,3%).

No presente estudo não foi observado aumento significativo no tamanho do folículo dominante. Um dos fatores que pode ter contribuído para este resultado foi o curto espaço de tempo entre a aplicação da eCG (D8) e a

mensuração do folículo dominante (D9). Por outro lado, não houve aumento significativo nas taxas de ovulação ou prenhez nos animais que receberam a eCG, corroborando com os resultados de diâmetro folicular.

Em suma, a maioria dos resultados apontam para um efeito benéfico da eCG que poderia ser mais ou menos acentuada a depender da condição corporal e/ou maturidade sexual das novilhas ao início do tratamento, porém não observados neste trabalho.

8 - CONCLUSÕES

1) Tanto o uso de dispositivos intravaginais contendo menores quantidades de progesterona como a utilização da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no início do tratamento de animais que apresentavam corpos lúteos funcionais foram efetivas em reduzir os níveis plasmáticos de progesterona a partir do D1 até o D8 do tratamento de sincronização do ciclo estral.

2) Embora a utilização de dispositivo intravaginal com menor nível de progesterona (0,558g) tenha propiciado aumento do diâmetro do folículo dominante no D9, não induziu incremento significativo nas taxas de ovulação e prenhez.

3) Houve correlação positiva entre o diâmetro folicular e as taxas de ovulação e de prenhez.

4) A utilização da eCG não foi efetiva em aumentar as taxas de ovulação e de prenhez, contrariando a hipótese inicial deste trabalho.

9 – COMENTÁRIOS FINAIS

O grau de desenvolvimento do aparelho reprodutivo pode ter uma importante influência na resposta aos protocolos de IATF, o que explicaria, pelo menos em parte, a variação dos resultados observados na literatura em novilhas Nellores.

Além das modificações nos tratamentos hormonais tradicionais, os parâmetros utilizados para selecionar os animais que iniciarão a atividade reprodutiva, tais como seleção genética para fertilidade, adequada nutrição e desenvolvimento corporal, tamanho de cérvix e útero, entre outros, devem ser levadas em consideração na implementação de programas de IATF em novilhas Nellores.

Mais estudos são necessários para entender as particularidades da fisiologia reprodutiva das novilhas Nellores, a fim de aprimorar os protocolos de IATF e melhorar as taxas de prenhez.

10 – REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P., MATTERI, R. L., KASTELIC, J. P., KO, J. C. H., GINTHER, O. J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, Cambrige, v. 94, p. 177-88, 1992.
- ALVAREZ, P., SPICER, L.J., CHASE JR., C.C., PAYTON, M.E., HAMILTON, T.D., STEWART, R.E., HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during and estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.* v.78, p.1291–1302, 2000.
- ARMSTRONG, D.G., WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Review of Reproduction*, v.2, p.139-146, 1997.
- BAO, B., GARVERICK, H.A., MITH, G.W., SMITH, M.F., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1158-1168, 1997.
- BARROS, C.M., ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. In: XVIII Reunião Anual da SBTE, Barra Bonita, *Acta Sci. Veterin.* v.32 (Suplemento), p.23-34, 2004.
- BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 19, p.9-22, 1995.
- BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arq. Fac.Vet.*, UFRGS, Supl.26, p.179-89, 1998.
- BARUSSELI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.479-486, 2004.
- BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., REIS, E.L., BÓ, G.A., Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.214 (abstract). 2003.
- BARUSSELI, P.S., MADUREIRA, E.H., MARQUES, M.O. Programas de IA al tiempo fijo en *Bos indicus*. Segunda Parte. Taurus. 2001.
- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-441, 2001.

BERGFELD, E.G.M, KOJIMA, F.N., WEHRMAN, M.E., CUPP, A.S., PETERS, K.E., MARISCAL, V., SANCHES, T., KITTOCK, R.J., GARCIA-WINDER, M., KINDER J.E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone comes from Esther na endogenous or exogenous source. *An. Reprod. Sci.*, v. 37, p.257-265, 1995.

BERISHA, B., SINOWATZ, F., SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. ,. v.67, p.162-171, 2003.

BLOM E. The ultrastruture of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-91, 1973.

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

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

BO, G.A., ADAMS, G.P., CACCIA, M., MARTINEZ, M., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.39, p.193–204, 1995.

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

BO, G.A., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology*, v.36, p.169–183, 1991.

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

BURKE, C.R., MUSSARD, M.L., GASSER, C.L., GRUM, D.E., DAY, M.L. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*, v.60, p.647-685, 2003.

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

CACCIA, M., BÓ, G.A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v49, p.341, 1998.

CALLEJAS, S.S., ALBERIO, R., CABODEVILA, J., DULOUT, F., ALLER, J., CATALANO, R., TERUEL, M. Influence of different doses of progesterone treatments on ovarian follicle status in beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.91, p.191-200, 2006.

CARRIÈRE, P.D., LEE, B. Direct radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using danazol (17- α -2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as displacing agent. *Can J Vet Res*, v.58(3), p.230-3, 1994.

CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* e *Bos taurus*. 2004. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo – São Paulo.

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

CASTILHO C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G.P., BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.189–96, 2007.

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

CLARKE, J.J. GnRH secretion. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION*, 5, 1988, Dublin. Anais... Dublin, p.1-9, 1988.

CHRISTIAN, R.E., CASIDA, L.E. The effect of progesterone in altering the oestrus cycle of the cow. *Journ. Anim. Sci.*, v.7, p.540, 1948 (Abstract).

COLAZO, M.G., KASTELIC, J.P., DAVIS, H., RUTLEDGE, M.D., MARTINEZ, M.F., SMALL, J.A., MAPLETOFT, R.J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Dom Anim Endocr.*, v. 34, p.109-117, 2008.

COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews*, v. 13, n. 4, p. 670-691, 1992.

CUSTER E.E., BEAL W.E., WILSON S.J., MEADOWS A.W., BERARDINELLI J.G., ADAIR R. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17 β and progesterone, and LH release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. *J Anim Sci.*, v.72; p.1282-1289, 1994.

CUTAIA, L., TRÍBULO, R., MORENO, D., BÓ, G.A. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology*, v.59, p.216 (abstract), 2003.

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

DIAS, C.C. Avaliação dos efeitos da concentração de progesterona nas respostas ao protocolo de sincronização da ovulação em novilhas Nelores cíclicas. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

ERENO, R.L. *Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular*. 2008. 65p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERNANDES, P., TEIXERIA, A.B., CROCCI, A.J., BARROS, C.M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF2alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology*. v.55, p.1521–1532, 2001.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*, v.47, p.1489–1505, 1997.

FIKE, K.E., DAY, M.L., INSKEEP, E.K., KINDER, J.E., LEWIS, P.E., SHORT, R.E., HAFS, H.D. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrus when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.2009–2015, 1997.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.*, v.82–83, p.109–126, 2004.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C., TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v.65, p.648–654, 2001.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, v.33, p.111–125, 1993.

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H.; Review on cattle reproduction in the tropics. Part4. Oestrus cycles. *Anim. Breed. Abst.*, v.58, p.697–707, 1990.

GAMBINI, A.L.G., MOREIRA, M.B.P., CASTILHO, C., BARROS, C.M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.22, p.210–210, 1998.

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

GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., CARVALHO, N.A.T., TORRES-JUNIOR, J.R.S., SOUZA, A.H., MADUREIRA, E.H., TRINCA, L.A., SARTORELLI, E.S., BARROS, C.M., CARVALHO, J.B.P., MAPLETOFT, R.J., BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852–858, 2008.

GINTHER, O.J., BEG, M.A., DONADEU, F.X., BERGFELD, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reprod. Sci.*, v.78, p.239–257, 2003.

- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, v.65, p.638–647, 2001a.
- GINTHER, O.J., BERGFELD, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameters ranking, and capacity for dominance. *Biol Reprod.*; v.65, p.345-350, 2001b.
- GINTHER, O.J., KOT, K., WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. v.48, p.75-87, 1997.
- GINTHER O.J., WILTBANK M.C., FRICKE P.M., GIBBONS J.R., KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v. 55, p.1187–94, 1996.
- GINTHER, O.J., KASTELIC, J.P., KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.20, p.187-200, 1989.
- GONG, J.G., WILMUT, I., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, v.45, p.611-622, 1996.
- HAFEZ, E.S.E. Anatomy of female reproduction. In: Reproduction in Farm Animal. Philadelphia: Lea & Febiger; 23, 1993.
- HANSEL, W., CONVEY, E.M. Physiology of the estrous cycle. *J. Animal Sci.*, v.57, p.404-424, 1983. Supplementum 2.
- HURNIK, J.F. Sexual behavior of female domestic mammals. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v.3, p.423-61, 1987.
- IRELAND, J.J Evidence for autocrine and paracrine roles of $\alpha 2$ -macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology*, v.145, p.2784-2794, 2004.
- KASTELIC, J.P., GINTHER, O.J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 26, p.13-24, 1991.
- KASTELIC, J.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, p.1269–1278, 1990.
- KINDER J.E., KOJIMA F.N., BERGFELD E.G.M., WEHRMAN M.E., FIKE K.E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci*; v.74, p.1424-1440, 1996.
- KNICKERBOCKER, J.J., THATCHER, W.W., BAZER, F.W., DROST, M., BARRON, D.H., FICHER, K.B., ROBERTS, R.M. Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function in cows. *J Anim Sci*, v.77, p.381-91, 1986.
- KULICK, L.J., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v.52, p.913–921, 1999.
- LAUDERDALE, J.W. Effects of PGF₂ on pregnancy and estrus cycle of cattle. *J.Anim. Sci.*, v.35, p.246 (Abstract), 1972.

LOSI, T.C., MARTINS JUNIOR, A.P., MENEGHETTI, M., VILELA, E.R., VASCONCELOS, J.L.M. Protocolos de sincronização da ovulação a base de progesterona e estradiol em vacas de corte paridas: 1. Avaliação de diferentes doses de prostaglandina. 2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 15. Anais... CD-ROOM (Abstract).

LOWMAM, B.G., SCOTT, N.A., SOMERVILLE, S.H. Condition scoring of cattle: the east of Scotland. Edinburgh: College of Agriculture (Bulletin), v.6, p.1-31, 1976.

MAPLETOFT, R.J., COLAZO, M.G., MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P. Ésteres de E2 para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. In V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL – 27-29 Junio, Huerta Grande, Córdoba. *Proceeding...* p.55-67, 2003.

MAPLETOFT, R.J., MARTINEZ, M.F., ADAMS, G.P., KASTELIC, J., BURNLEY, C.A. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology*, v.51, p.411, 1999.

MAPLETOFT, R.J., BÓ, G.A., ADAMS, G.P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v.28, n.1, p.24-51, 2000. Suplemento. Apresentado à XV Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões.

MACMILLAN, K.L., BURKE, C.R. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* v.42, p.307-320, 1996.

MANTOVANI, A.P., SÁ FILHO, M.F., REIS, E.L., NICHI, M., BO, G.A., BARUSELLI, P.S. Efeito da concentração plasmática de progesterona na dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus*. *Acta Scien. Veterin.*, v.32 (suplemento), p.232., 2004.

MARQUES, M.O., REIS, E.L., CAMPOS FILHO, E.P., BARUSSELI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: Proceedings 5. Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, p. 392, 2003. (abstract).

MARQUES, M.O., SA FILHO, M.F., GIMENES, L.U., FIGUEIREDO, T.B., SÓRIA, G.F., BARUSELLI, P.S. Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção á inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. *Acta Scie. Veter.*, v.33, (suplemento 1), p.287 (abstract), 2005.

MARTINEZ, M.F., ADAMS, G.P., BERGFELT, D.R., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*, v.57, p.23–33, 1999.

MCDOWELL, C.M., ANDERSON, L.G., KINDER, J.E., DAY, M.L. Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.850-855, 1998.

MILVAE, R.A., HINCKLEY, S.T., CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v.45, p.1327-1349, 1996.

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, 98p. Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo.

MOMONT, H.W., SEGUIN, B.E. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF₂ α products: Implacation for AI programs for dairy cattle. In: International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Illinois. Proceedings... Illinois: University of Illinois, v.3, p.336, 1984.

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

MUKASA-MUGERWA, E. A review of reproductive performance of female Bos indicus (Zebu) cattle. *ILCA monog.* v.6, p. 1-34, 1989.

MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J.Reprod.Fertil.* v.90, p.523-33, 1990.

MURPHY, B.D., MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rewiews*, v.12, n.1, p.27-44, 1991.

NOGUEIRA, M.F.G, BURATINI, Jr.J., PRICE, A.C.S., CASTILHO, M.G.L., BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol. Reprod. and Development*, v.74, p.680-686, 2007.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Animal Sci.*, v.69, p.817-830, 1990.

PERES, R.F.G. Efeito da concentração pré e pós ovulatória de progesterona em protocolos de IATF em fêmeas Nelore. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

PERRY, G.A., SMITH, M.F., ROBERTS, A.J., MACNEIL, M.D., GEARY, T.W. Effect of ovulatory follicle size on pregnancy rates and fetal mortality in beef heifer. *J. Anim. Sci.*, v.82, (suppl. 1), p.101, (abstract 99), 2004.

PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in uterus in cattle. *Theriogenology*, v.29, p.21-37, 1988.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R., Encarnação, R.; Padovani, C.R. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-81, 1998.

PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C., STEVENSON, J.S., OTTOBRE, J.S., GARVERICK, H.A., ANDERSON, L.L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.295–300, 1997.

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

PURSLEY, J.R., MEE, M.O., BROWN, M.D., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF2 α . *J. Anim. Sci.*, v.72, p.230, 1994.

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

ROBERSON, M.S., WOLFE, M.W., STUMPF, T.T., KITTOCK, R.J., KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.*, v.41, p.997-1003, 1989.

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

SA FILHO, M.F., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S., CREPALDI, G.A., MEDALHA, A.G., BARUSELLI, P.S. IATF em novilhas. *Bioteecnologias da Reprodução em Bovinos* (3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), Londrina, p.54-67, 2008.

SÁ FILHO, M.F., REIS, E.L., VIEL JR, J.O., NICH, M., MADUREIRA, E.H., BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. *Act. Sci. Vet., Supl.*, v.32, p.235, 2004.

SANTOS, J.E.P., SA FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. *Bioteecnologias da Reprodução em Bovinos* (2º Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada), Londrina, p.30-54, 2006.

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

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

SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1403–9, 2001.

SAS. Statistical Analysis System. SAS/STAT Users Guide, Release 9.1 Edition 2002. Cary, NC, USA, SAS Inst., Inc.

SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.*, v.83, p.663-71, 1988.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., HYNES, N., MATTIACI, M.R., ROCHE, J.F. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7? *Theriogenology*, v. 33, p. 677, 1990.

SCHAMS, S., MENZER, C.H., SCHALLENBERGER, E., HOFFMAN, B., HAHN, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: *Control of Reproduction the Cow*. Commission of the European Communities, Luxembourg, p.25-80, 1978.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol. Reprod.*, v.39, p.308-17, 1988.

SIMÕES, R.A.L., ROSA, F.L., PIAGENTINI, M., SATRAPA, R.A., ERENO, R.L., NABHAN, T., TRINCA, L.A., NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Follicular diameter and ovulation rate in Nelore cows treated with LH. 35th ANIMAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY (IETS), p. 186-187, 2009.

STANISLAUS, D., PINTER, J.H., JANOVICK, J.A., CONN, P.M. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Molec. And Cell. Endocr.*, v.144, p.1-10, 1998.

STUMPF, T.T., DAY, M.L., STOTTS, J.A., WOLFE, M.W., PENNEL, P.L., KITTOCK, R.L., KINDER, J.E. Effect of oestradiol on luteinizing hormone secretion during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.41, p.91-99, 1989.

THATCHER, W.W., DROST, M., SAVIO, J.D., MACMILLAN, K.L., ENTWISTLE, K.W., SCHIMMITT, E.J., DE LA SOTA, R.L., MORRIS, G.R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.33, p.27-49, 1993.

THUNDATHIL, J., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. *Canad. j. Veterin. Reser.*, v.62, p.314-316, 1998.

TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., VILLEUVE, P., DUFOUR, J.J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology*, v.38, p.1131-44, 1992a.

TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., VILLEUVE, P., DUFOUR, J.J. Influence of na agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.1904-10, 1992b.

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

VASCONCELOS, J.L.M., ARAÚJO, T.P.B., CERRI, R.L.A., VALARELLI, R.L., WEDHSLER, F.S. Ovulation and synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows during two seasons when receiving the PGF2 α injection on D6 or 7 of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.214 (Abstract), 2000.

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

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

WILTBANK, J.N., INGALLS, J.E., ROWDEN, W.W. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combination with gonadotrophins on the estrous cycle of beef heifers. *J. Anim. Sci.* v.20, p.341–346, 1961.

XU, Z., GAVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and lutenizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, 1995;65:951–7.

Trabalho científico escrito de acordo com as normas da revista *Theriogenology*, exceto pela posição das tabelas e figuras.

Taxas de ovulação e prenhez em novilhas nelores cíclicas após utilização de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF), com diferentes concentrações de progesterona, associadas ou não à aplicação de eCG.

Marcelo F. Pegorer¹; Ronaldo L. Ereno¹; Rafael A. Satrapa²;

Luzia A. Trinca³; Ciro M. Barros^{2a}

*Depto. de Reprodução Animal – FMVZ¹, Depto. de Farmacologia², Depto. De
Bioestatística³ - IB-UNESP, Botucatu-SP.*

^aCorresponding author: Ciro M. Barros; fax: +55 14 3815-3744; e-mail:
cmbarros@ibb.unesp.br

Abstract

Previous reports indicate that high concentration of serum progesterone (P4) decreases LH pulse frequency, and consequently follicular growth. This may reduce the efficiency of fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols that utilize P4 in *Bos indicus* heifers. The objective of the present work was to evaluate the influence of different P4 concentrations associated or not with eCG in the ovulation and pregnancy rates of Nellore heifers submitted to hormonal protocols for FTAI. In experiment (exp.) 1, heifers (n=15) pre-synchronized with a hormonal treatment were randomly allocated in four experimental groups. At the time of intravaginal device insertion (Day 0 = D0) all animals received 2 mg of estradiol benzoate (EB) and a intravaginal progesterone-releasing device containing 0.558g of P4 (Triu®, group 0.5G, n=4) or 1g of P4 (Cronipres®, group 1G, n = 4), or 0.558g of P4 and PGF2α (150 µg d-cloprostenol, group 0.5G/PGF, n = 4), or 1g of P4 and PGF2α (group 1G/PGF, n = 3). Eight days later (D8), PGF2α (150 µg d-cloprostenol) was administered to all heifers, the P4 source was removed. Twenty four hours after removing the intravaginal device, the heifers were treated with EB (1 mg, i.m.). Blood samples were collected during the days 0, 1, 2, 4, 8 and 10 to evaluate plasma P4 concentration. In exp. 2, cyclic Nellore heifers (n=292) were treated with the same protocols as in the exp. 1. However, 30 to 36 h later all animals were fixed-time inseminated on D10. In exp. 3, heifers (n = 459) received the treatments described to groups 0.5G/PGF and 1G/PGF associated with 300 UI of eCG (i.m., groups 0.5G/PGF/eCG and 1G/PGF/eCG) at the time of intravaginal device removal (D8). In a subset of heifers from each group blood samples were collected on D8 and ovarian ultrasonography was performed to determine the diameter of the dominant follicle on D9 (exp.3) and the ovulation rate on D12 (exp. 2 and 3). The analysis of variance to repeated measurements was used to compare P4 levels, and the binary variables (ovulation and pregnancy rates) were analyzed by logistic regression. In exp. 1, P4 concentrations were higher in animals that had received the device content 1g of P4 than in those that had received the device content 0.558g of P4, and lower in heifers that had received PGF2α on D0. In both exp. 2 and 3 there was no difference on ovulation (65 to 77%) and pregnancy (exp.2: 26 to 33%; exp.3: 39 to 43%) rates among the several groups. In exp. 3, the animals which received the devices with a lower concentration of P4 had a larger diameter of the dominant follicle (10.3±0.2 vs 9.3±0.2 mm; P<0.01) on D9. It is concluded that reduction of P4 concentration in the intravaginal device (1.0 to 0.558g) or the administration of PGF2α at the beginning of the treatments decrease blood concentrations of P4 between days 1 and 8 of the IATF protocols. However, although the use of intravaginal devices with lower P4 contributed to increase the dominant follicle diameter on D9, there was no significant increase on ovulation and pregnancy rates. Additionally, the association of eCG to FTAI protocols did not improve follicular growth or ovulation and pregnancy rates.

Key-words: FTAI, progesterone, Nellore heifers, artificial insemination, eCG

1. Introdução

Dentre as biotécnicas utilizadas na reprodução animal a inseminação artificial continua a ser uma das mais importantes para acelerar a evolução genética dos rebanhos [1]. Um dos maiores entraves para a incorporação desta técnica pelos criadores consiste na observação do cio, que requer tempo e mão de obra especializada. Além disso, nas fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (em torno de 11 horas) [2] e a incidência de cios noturnos [3] dificultam ainda mais a detecção e prejudicam a implantação de programas convencionais de inseminação artificial [4,5]. A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular [6,7,8] tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar cio) em taurinos [9,10,11] e zebuínos [12,13].

Existem diversos protocolos hormonais para inseminação em tempo fixo (IATF) que originam taxas de prenhez ao redor de 50 a 60% em vacas zebuínas [4,14,15]. No entanto os resultados em novilhas zebuínas (*Bos indicus*) são em torno de 15 a 30%; [16,17]. Recentemente Carvalho et al. [18] demonstraram que a utilização de PGF2 α no D0 (dia da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona) em protocolo de IATF, reduziu os níveis circulantes de progesterona ($5,2 \pm 0,1$ vs $3,3 \pm 0,0$ ng/mL; $P < 0,05$), levando a um maior crescimento do folículo dominante ($1,2$ mm/dia vs $0,9$ mm/dia) e melhores taxas de ovulações ($79,4\%$ vs $52,7\%$; $P < 0,05$).

Alguns autores [19,20,21] relatam que a elevação dos níveis plasmáticos de progesterona causam uma retroalimentação negativa no hipotálamo resultando em menor pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH). Desta forma ocorreria menor crescimento do folículo dominante, que por sua vez não teria tamanho suficiente para ovular durante o pico de LH, resultando em menores taxas de prenhez. Assim sendo, a utilização de dispositivos intravaginais contendo menores concentrações de progesterona ($0,558$ g), ou ainda, qualquer

mecanismo que possa reduzir os níveis circulantes de P4, como a utilização de PGF2 α no início do protocolo hormonal, em novilhas cíclicas, poderia resultar em melhores taxas de ovulação e prenhez.

Outra forma para aumentar o crescimento e maturidade final do folículo dominante, seria pela utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG). Sua atividade semelhante ao FSH e ao LH pode estimular o crescimento folicular e/ou facilitar a ovulação [22] promovendo aumento na taxa de prenhez das vacas em anestro pós-parto com baixa condição corporal [15,23].

Objetiva-se com o presente trabalho determinar se a redução dos níveis de progesterona plasmática em protocolos de IATF contribui para aumentar as taxas de ovulação e prenhez em novilhas cíclicas da raça nelore tratadas com dispositivos intravaginais contendo progesterona. Além disso, determinar se a utilização da eCG contribui com o aumento do tamanho do folículo dominante, melhorando as taxas de ovulação e prenhez.

2. Material e Método

2.1. Experimento 1

2.1.1. Localização e animais

O experimento foi conduzido na Estância Rosalito (latitude 22°55'S e longitude 49°40'O), localizada no município de Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo, durante o mês de março de 2006.

Foram utilizadas novilhas (n = 15) da raça Nelore, com dois a três anos de idade, pesando $296,9 \pm 3,6$ kg (média $\pm$ EPM), com condição corporal de $2,81 \pm 0,02$ (média $\pm$ EPM em uma escala de 1 a 5 [24]), mantidas em pastagens de *B. brizantha* e suplementadas com sal mineral e água a vontade. Os animais foram pesados individualmente no começo (D -17) e no final (D12) do experimento, sempre no início do período da manhã.

2.1.2. Grupos Experimentais

Novilhas da raça Nelore (n=15), com presença de corpo lúteo ao exame ultrassonográfico, foram previamente sincronizadas utilizando-se um dispositivo intravaginal contendo 1 grama de progesterona (D -17) durante 9 dias (Cronipres[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina) mais 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Bioestrogen, Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM) no início do tratamento (D0). No dia da retirada do dispositivo (D -9) os animais receberam 150 µg de d-cloprostenol (Croniben[®], Biogenesis, Buenos Aires, Argentina, via IM) e vinte e quatro horas depois (D -8) 1 mg de benzoato de estradiol (BE). Os animais foram avaliados de 60 a 72 horas após a aplicação do BE para determinar a ovulação.

As novilhas que apresentaram ovulação (constatada pelo exame ultrassonográfico; n=15) foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos 0,5G e 1G receberam, respectivamente, um dispositivo contendo 0,558g e 1g de P4 e 2 mg de benzoato de estradiol. Os animais dos grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF receberam os mesmos tratamentos, mais 150 µg de d-cloprostenol (Croniben[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM) no dia da inserção do dispositivo intravaginal (D0).

2.1.3 Coleta de sangue e radioimunoensaio da progesterona

Foram realizadas colheitas de sangue através da punção da veia coccígea em tubos heparinizados (BD Vacutainer[®], New Jersey, USA; 10 ml) nos dias 0, 1, 2, 4, 8 e 10 do tratamento (Figura 1). Após a colheita as amostras foram mantidas em recipientes com gelo por no máximo 5 horas. As amostras foram centrifugadas a 1600 xg por 20 minutos e armazenadas a -20°C, para posterior dosagem da progesterona. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas, em um único ensaio, com “Kit” de Progesterona da

DSL (32400, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,49%.

2.2 Experimento 2

2.2.1. Localização e animais

O experimento foi conduzido na Fazenda Cristal (latitude 22°31' S; longitude 50°04'O), localizada no município de Campos Novos Paulista, estado de São Paulo, e na Fazenda Pontal (latitude 14°27' S; Longitude 51°43' O), localizada no município de Nova Xavantina, estado de Mato Grosso, durante os meses de novembro e dezembro de 2006. Foram utilizadas novilhas (n = 292) da raça Nelore, com dois a três anos de idade, pesando entre 270 e 430 kg, com condição corporal de $2,81 \pm 0,02$ (média $\pm$ EPM em uma escala de 1 a 5 [24]), mantidas em pastagens de *B. brizantha* ou *B. decumbens*, suplementadas com sal mineral e água a vontade.

2.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram previamente submetidos a dois exames ultrassonográficos dos ovários, com 10 dias de intervalo, a fim de determinar a presença de corpo lúteo. Somente as novilhas com CL em pelo menos uma das ultrassonografias foram utilizadas no experimento. Estas novilhas foram distribuídas ao acaso em quatro grupos experimentais. As novilhas dos Grupos 0,5G (n = 76) e 1G (n = 70) receberam, respectivamente, um dispositivo intravaginal contendo 0,558 g (Triu B[®]; Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina) ou 1 g (Cronipres[®]; Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina) de progesterona no D0, e benzoato de estradiol (Bioestrogen[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, 2mg, via IM). Nove dias mais tarde (D8) foi administrada 150µg de d-cloprostenol (Croniben[®], Biogenesis-Bagó, Buenos Aires, Argentina, via IM), e o dispositivo intravaginal foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do dispositivo as novilhas foram tratadas com BE (1,0 mg, via IM) e 30-36 h depois os animais foram inseminados artificialmente sem observação de cio (IATF).

Os animais dos grupos 0,5G/PGF (n = 75) e CRON/PGF (n = 71) foram tratados de forma similar aos grupos 0,5G e 1G, respectivamente, exceto que receberam 2 doses de PGF2 α (75 μ g d-cloprostenol; via IM; no D0 e D8).

No momento da introdução do dispositivo foi determinada a condição corporal de todos os animais, de acordo com os mesmos critérios utilizados no primeiro experimento.

2.2.3. *Touros e inseminadores*

Foram utilizadas doses de sêmen comerciais de 12 touros, previamente analisados quanto às características de motilidade e vigor [26]. As doses de sêmen utilizadas foram distribuídas proporcionalmente entre os grupos tratados.

A maioria das inseminações foi realizada por um único inseminador experiente, as demais foram realizadas por outros dois inseminadores, também experientes, distribuídos proporcionalmente entre os grupos.

2.2.5. *Ultrassonografia*

Após a última aplicação de BE (D-9) foram realizados exames ultrassonográficos (Aloka SSD 500, transdutor de 5,0 MHz) em aproximadamente metade dos animais de cada grupo [0,5G(n = 28); 1G (n = 35); 0,5/PGF (n = 34); 1G/PGF (n = 31)] para identificação do folículo dominante (FD). As novilhas que não apresentaram folículos maiores que 5 mm no dia da ultrassonografia (D9) foram consideradas como não sincronizadas. Portanto, a taxa de sincronização foi determinada pela razão entre o número de animais com FD no D9 maiores que 5 mm e o total de animais tratados.

No décimo segundo dia, 72 horas após a aplicação da segunda dose do BE, foi realizado novo exame ultrassonográfico para determinar a taxa de ovulação dos folículos detectados no D9.

Cerca de 35 dias após a IATF foram realizados o diagnóstico de gestação, por exame ultrassonográfico.

2.3 Experimento 3

2.3.1. Animais e localização

O experimento 3 foi conduzido durante a estação reprodutiva de novembro 2007 a maio de 2008, nas mesmas fazendas do experimento 2. Foram utilizadas novilhas Nellores (n = 459), com idade entre 2 e 3 anos e condição corporal de $2,8 \pm 0,01$ (média $\pm$ EPM, em uma escala variando de 1 a 5 [24]).

2.3.2. Grupos experimentais

As novilhas foram distribuídas ao acaso em quatro grupos experimentais. Dois grupos idênticos aos do experimento 2 (grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF) e dois novos grupos (0,5G/PGF/eCG e 1G/PGF/eCG) semelhante aos primeiros, exceto que os animais receberam 300 UI de eCG (Novormon, Shering-Plough, New Jersey, USA; via IM) no momento da retirada do dispositivo intravaginal (D8).

2.3.3. Colheita de sangue e radioimunoensaio de progesterona

Foram selecionados aleatoriamente alguns animais de cada grupo [0,5G/PGF (n = 38); 1G/PGF (n = 47); 0,5G/PGF/eCG (n = 39) e 1G/PGF/eCG (n = 43)] para colheita das amostras. Após a colheita, as amostras (10 ml) foram imediatamente centrifugadas a 1600 xg por 20 minutos e o plasma obtido armazenado a -20°C , até o momento da análise por meio de técnica de radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Knickerbocker et al. [27], modificadas por Carriere e Lee [28]. Os coeficientes de variação intra e inter ensaios foram de 4,56% e 11,48%, respectivamente.

203

204 2.3.4. *Ultrassonografia*

205 Os exames ultrassonográficos dos animais foram realizados de forma semelhante ao
206 segundo experimento. Além disso, no momento da aplicação do BE (D9) foram realizadas
207 mensurações do diâmetro do folículo dominante em um grupo de novilhas [0,5G/PGF (n=
208 48); 1G/PGF (n = 41); 0,5G/PGF/eCG (n = 51); 1G/PGF/eCG (n = 55)].

209 O diagnóstico de gestação foi realizado cerca de 30 dias após a IATF, por exame
210 ultrassonográfico.

211

212 2.3.5. *Touros e inseminadores*

213 Foram utilizadas doses de sêmen comerciais de 8 touros, sendo seis da raça Nelore e
214 dois Brangus, previamente analisadas quanto às características de motilidade e vigor [26]. As
215 doses de sêmen foram distribuídas proporcionalmente entre os grupos tratados.

216 Todas as inseminações foram realizadas por um único inseminador experiente.

217

218 2.4. *Análise estatística*

219 Para análise dos níveis plasmáticos de progesterona do experimento 1 foi utilizada a
220 análise de variância para medidas repetidas, através do programa PROC GENMOD do SAS
221 [25], verificando efeito principal da aplicação de PGF₂ α no D0, uso de diferentes
222 dispositivos intravaginais com diferentes concentrações de progesterona (0,558 vs 1 grama de
223 P4), tempo e suas interações.

224 As variáveis taxas de sincronização do folículo dominante, ovulação e prenhez, do
225 segundo e terceiro experimentos, foram analisadas por regressão logística, através do
226 programa PROC GENMOD do SAS [25]. Para as análises de taxas de prenhez foram
227 consideradas no modelo o efeito do tipo de dispositivo intravaginal, aplicação ou não da PGF
228 no D0, fazenda, inseminador (exp. 2), touro, condição corporal e interações. As medidas do

diâmetro folicular no D9 e nível plasmático de progesterona no D0 e D8 foram analisados por análise de variância através do programa PROC-GLM do SAS [25].

3. Resultados

3.1. Experimento 1

No início do experimento (D0) os níveis circulantes de progesterona não foram significativamente diferentes, variando de 5,8 a 7,5 ng/mL. De maneira geral os níveis circulantes de progesterona durante o período foram mais altos para os animais do grupo 1G e mais baixos para aqueles do grupo 0,5G/PGF. Os animais dos demais tratamentos (grupos 0,5G e 1G/PGF) apresentaram níveis circulantes de P4 intermediários (Figura 1).

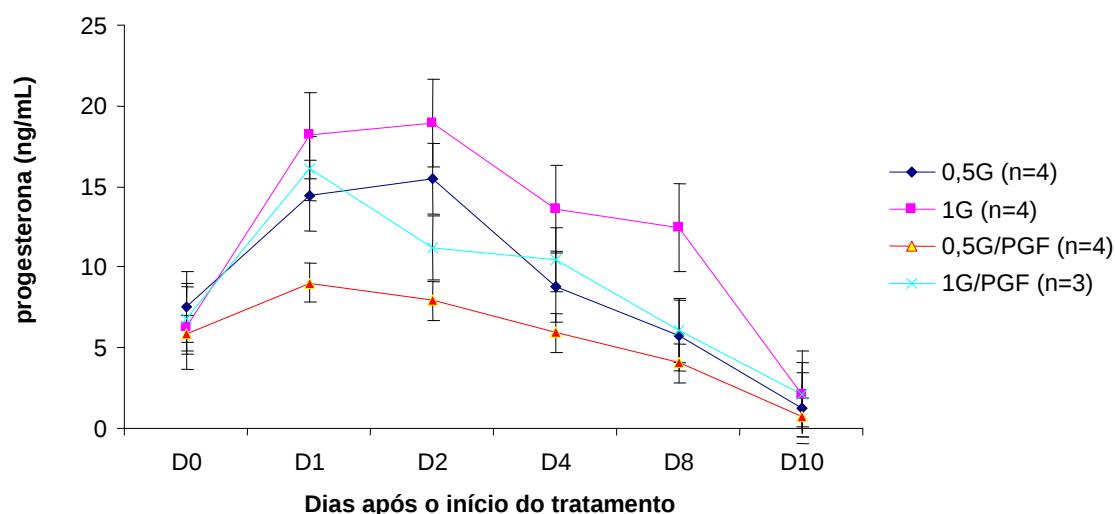


Figura 1. Níveis plasmáticos de progesterona em novilhas Nelores tratadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g (grupo 0,5G) ou 1 g de progesterona (grupo 1G) associadas (0,5G/PGF; 1G/PGF) ou não à PGF2 α no D0.

3.2. Experimento 2

Não houve efeito significativo de fazendas ($P = 0,26$), touros ($P = 0,91$) e inseminadores ($P = 0,86$). Assim sendo os resultados obtidos nas duas fazendas foram agrupados.

Os tratamentos foram efetivos em sincronizar o ciclo estral dos animais, originando taxas de ovulações superiores a 65%. A utilização de dispositivos intravaginais contendo 0,5G de P4 não resultou em melhores taxas de prenhez, ($P = 0,67$; Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de sincronização do folículo dominante (folículos >5 mm no D9/total de animais tratados), ovulação e prenhez em novilhas Nellores sincronizadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558 g (grupo 0,5G) ou 1 g de P4 (grupo 1G) e associadas à 75 μ g de PGF2 α no dia da inserção do dispositivo intravaginal (grupos 0,5G/PGF; 1G/PGF).

Tratamentos	SINCRONIZAÇÃO DA ONDA (%)	OVULAÇÃO (%)	PRENHEZ (%)
0,5G	28/25 (89,3)	28/19 (67,8)	76/23 (30,2)
1G	35/33 (94,3)	35/27 (77,1)	70/18 (25,7)
0,5G/PGF	34/34 (100)	34/26 (76,5)	75/25 (33,3)
1G/PGF	31/26 (83,9)	31/20 (64,5)	71/20 (28,2)
Efeitos principais			
0,5G	62/59 (95,2)	62/45 (72,6)	151/48 (31,8)
CRON	66/59 (89,4)	66/47 (71,2)	141/38 (26,9)
Com PGF	65/60 (92,3)	65/46 (70,7)	146/45 (30,8)
Sem PGF	63/58 (92,1)	63/46 (73,0)	146/41 (28,0)

*não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$)

A utilização da PGF2 α no início do protocolo (D0) não interferiu nas taxas de ovulação ou prenhez ($P = 0,74$).

3.3. *Experimento 3*

Não houve efeito significativo de fazendas ($P = 0,69$), touros ($P > 0,3$) e inseminadores ($P = 0,4$). Assim sendo os resultados obtidos nas duas fazendas foram agrupados.

A utilização de dispositivos intravaginais contendo 0,558 g de P4 (grupo 0,5G) resultou no D9 em folículos dominantes de maior diâmetro ($P < 0,01$). No entanto, não afetou significativamente as taxas de ovulação ($P = 0,42$) e de prenhez ($P = 0,45$; Tabela 2).

O emprego da eCG no momento da retirada do dispositivo não influenciou o tamanho do folículo dominante no D9 ($P = 0,78$), assim como as taxas de ovulação ($P = 0,79$) ou prenhez ($P = 0,49$).

293 Tabela 2. Taxa de sincronização do folículo dominante (folículos >5mm no D9/total de
 294 animais tratados), diâmetro folicular ($\varnothing$ FD; média $\pm$ EPM) no D9 e taxas ovulação e
 295 prenhez em novilhas Nellores sincronizadas com dispositivos intravaginais contendo 0,558g
 296 ou 1 g de P4 mais a PGF2 α no D0 (grupos 0,5G/PGF e 1G/PGF), associadas a 300 UI de
 297 eCG (TRIU/PGF/eCG; CRON/PGF/eCG) na retirada do dispositivo (D8).

298
 299

TRATAMENTOS	SINCRONIZAÇÃO DA ONDA (%)	$\varnothing$ FD $\pm$ EPM no D9	OVULAÇÃO (%)	PRENHEZ (%)
0,5G/PGF	38/34 (89,5)	10,3 $\pm$ 0,35 mm (n = 48)	38/27 (71)	109/42 (38,5)
1G/PGF	47/37 (78,7)	9,3 $\pm$ 0,34 mm (n = 50)	47/30 (63,8)	119/47 (39,5)
0,5G/PGF/eCG	39/38 (97,4)	10,2 $\pm$ 0,29 mm (n = 51)	39/30 (76,9)	115/50 (43,4)
1G/PGF/ECG	43/40 (93)	9,4 $\pm$ 0,29 mm (n = 55)	43/28 (65,1)	116/46 (39,6)
EFEITOS PRINCIPAIS				
0,5G	77/72 (93,5)	10,3 $\pm$ 0,22* mm (n = 99)	77/57 (74)	224/92 (41)
1G	90/77 (85,5)	9,3 $\pm$ 0,21* mm (n = 105)	90/58 (64,4)	235/93 (39,5)
0 UI ECG	85/71 (83,5)	9,8 $\pm$ 0,24 mm (n = 98)	85/57 (67)	228/89 (39)
300 UI eCG	82/78 (95,1)	9,7 $\pm$ 0,2 mm (n = 106)	82/58 (70,7)	231/96 (41,5)

300 *Diferença significativa entre os diâmetros foliculares dos grupos 0,5G e 1G (P<0,01)
 301 $\varnothing$ FD: diâmetro do folículo dominante.

302

303 Os animais tratados com os dispositivos intravaginais contendo 0,558g e 1g de P4
 304 apresentaram concentrações plasmáticas de P4 semelhantes tanto no D0 (P = 0,94) quanto no
 305 D8 (Tabela 3).

306

Tabela 3. Nível plasmático de progesterona (média $\pm$ EPM) no início (D0) e no dia da retirada do dispositivo intravaginal (D8) em novilhas Nellores cíclicas tratadas com 0,558 g (grupo 0,5G) ou 1g (grupo 1G) de P4 associados à PGF2 no D0.

	P4 - D0 (ng/mL)	P4 - D8 (ng/mL)
0,5G	3,92 $\pm$ 0,54 (n = 24)	4,39 $\pm$ 0,35 (n = 43)
1G	3,86 $\pm$ 0,47 (n = 30)	4,58 $\pm$ 0,30 (n = 54)

4. Discussão

No presente estudo a utilização de dispositivos intravaginais contendo diferentes níveis de progesterona (0,558g vs 1,0g) e a aplicação da PGF2 α no início do protocolo (D0) alteraram os níveis circulantes de progesterona (exp.1). Porém, estes tratamentos, assim como a utilização de 300 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal não alteraram significativamente as taxas de sincronização do ciclo estral, ovulação e prenhez, contrariando a hipótese inicial deste trabalho. Por outro lado, a utilização de dispositivos contendo 0,558g de P4 promoveu aumento significativo do diâmetro do folículo dominante no D9 do protocolo de IATF (exp. 3).

Tanto no segundo quanto no terceiro experimentos, a utilização de dispositivos com diferentes doses de progesterona não influenciou de modo significativo as taxas de ovulação ou prenhez. Resultados semelhantes foram observados por Peres [29] em novilhas tratadas com dispositivos intravaginais de 1° ou 3° uso (CIDR[®]). No entanto, Dias [30], do mesmo grupo de pesquisa, ao comparar as taxas de prenhez em novilhas cíclicas tratadas com dispositivos intravaginais de 1°, 2° ou 3° uso (CIDR[®]) observou melhora significativa dos resultados. As taxas de prenhez observadas por Peres [29], assim como as do presente estudo, foram mais altas que as relatadas por Dias [30], o que pode ter minimizado um possível efeito positivo do uso de dispositivos contendo menos progesterona.

É interessante notar no presente estudo que, no experimento 2, as taxas de ovulação e prenhez foram mais baixas do que no experimento 3 e o uso do dispositivo contendo 0,558g de progesterona aumentou, embora não significativamente, as taxas de prenhez. No entanto, no ano seguinte, quando houve uma melhora geral nas taxas de prenhez (exp. 3), este efeito não foi detectado. Embora os dois experimentos tenham sido realizados em condições semelhantes (fazenda, manejo dos animais, inseminadores, condição corporal) é possível que a condição de maturidade sexual tenha sido diferente. O experimento 2 foi realizado no início da estação de monta (novembro e dezembro), enquanto que o terceiro experimento se estendeu de novembro a maio. Byerley et al. [31] relataram que novilhas cobertas no primeiro cio após a puberdade apresentaram menores taxas de concepção quando comparadas com aquelas cobertas ao terceiro cio. Segundo estes autores a fertilidade de novilhas cíclicas tende a aumentar conforme o número de ciclos estrais que elas apresentam quando colocadas em reprodução.

No primeiro experimento a aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ reduziu os níveis circulantes de progesterona nos dias 1, 2 e 8 após o início dos tratamentos. Estes resultados eram esperados, devido ao efeito luteolítico da $\text{PGF2}\alpha$, e foram semelhantes aos observados por Carvalho et al. [18] nos dias 3, 6 e 8 após a utilização do agente luteolítico, em protocolo hormonal semelhante ao do presente trabalho.

A utilização da $\text{PGF2}\alpha$ no início do protocolo PEPE não resultou em aumento significativo nas taxas de ovulação e prenhez corroborando os resultados apresentados por Marques et al. [16], em novilhas da raça Nelore tratadas com protocolos similares aos dos experimentos 2 e 3. Por outro lado, Carvalho et al. [18], ao utilizarem novilhas cíclicas e pré-sincronizadas observaram que os animais tratados com $\text{PGF2}\alpha$ apresentaram aumento no tamanho dos folículos dominantes nos dias 8 e 9 e maiores taxas de ovulações.

É interessante notar que a principal diferença entre os experimentos acima citados é que Carvalho et al. [18] utilizaram novilhas pré-sincronizadas enquanto que nos outros

trabalhos as novilhas se encontravam em dias aleatórios do ciclo estral. A resposta à aplicação da PGF2 α em dia aleatórios do ciclo pode ser bastante variável. Vacas no início do ciclo (1° ao 5° dia) apresentam pouca ou nenhuma resposta à PGF2 α e seus análogos [32], mas a regressão do corpo lúteo pode ser de até 100% quando a PGF2 α é aplicada no dia 7 do protocolo Ovsynch em vacas leiteiras [33] ou em vacas Nelore sincronizadas com benzoato de estadiol e progesterona [34]. Para evitar a fase refratária do corpo lúteo, Peres [29] adiou a aplicação da PGF2 α para o dia 7 do protocolo PEPE em vacas solteiras e observou melhora significativa no tamanho do folículo ovulatório no D11 (11,54 $\pm$ 0,21 vs 10,84 $\pm$ 0,21 mm) e nas taxas de prenhez (52 vs 36,4%). Portanto, a variação da resposta à aplicação da PGF2 α pode explicar, ao menos em parte, os resultados acima.

Alguns trabalhos relatam efeito positivo da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no tamanho do folículo pré-ovulatório, melhorando as taxas de ovulação e prenhez [29,15]. A capacidade da eCG em se ligar a receptores de LH e FSH pode ser o mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro folicular e da taxa de sincronização [35]. No presente estudo a aplicação de 300 UI de eCG não influenciou significativamente as taxas de prenhez (39,0 vs 41,5%), contrastando com os dados de Marques et al. [16], que avaliaram o efeito da administração de PGF2 α no D0 e da eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, D8) em novilhas Nelore. Os animais que receberam eCG (400 UI, IM) apresentaram maiores taxas de prenhez (15,7 vs 34,9%). O efeito positivo do eCG, no estudo realizado por Marques et al. [16], pode ter sido favorecido pelas baixas taxas de prenhez observadas nos animais do grupo controle (15,7%). Entretanto, Peres [29] trabalhando com elevado número de novilhas Nelore (n = 1153) observou significativo aumento na taxa de prenhez dos animais tratados com eCG (47%) quando comparados a aqueles que não receberam esta gonadotrofina (41,3%). Em suma, a maioria dos resultados apontam para um efeito benéfico da eCG que poderia ser mais ou menos acentuado a depender da condição

corporal e/ou maturidade sexual das novilhas ao início do tratamento, porém não observado neste trabalho.

Desta forma pode-se concluir que a aplicação de PGF2 α ao início do protocolo de IATF, assim como o uso de dispositivo intravaginal contendo 0,558g de progesterona resulta em menores níveis plasmáticos de P4, durante o período de tratamento, em novilhas pré-sincronizadas. O uso de dispositivos intravaginais contendo 0,558g de P4 foram efetivos em aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório no D9, mas não resultaram em maiores taxas de ovulação ou de prenhez. A utilização da eCG não foi efetiva em aumentar o diâmetro do folículo dominante (no D9) e melhorar as taxas de ovulação ou de prenhez, contrariando a hipótese inicial do trabalho.

5. Referências

- [1] Pegorer MF, Ereno RL, Pinheiro VG, Barros CM. Novos tratamentos e informações sobre a sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo de vacas e novilhas zebuínas. In: 2 Congresso Internacional de Reproducción Bovina, 2008, Bogotá – Biotecnologia aplicada a todas las explotaciones productivas, 2008; 83-92.
- [2] Bo GA, Baruselli OS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in Bos Indicus cattle. Animal Reprod. Sci 2003; 78: 307-326.
- [3] Pinheiro OL, Barros CM, Figueredo RA, Valle ER, Encarnação R, Padovani, CR. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. Theriogenology 1998; 49: 667-81.
- [4] Barros CM, Figueiredo RA, Pinheiro OL. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. Rev. Bras. Reprod. Anim., 1995; 19: 9-22.
- [5] Mizuta, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, Progesterona e Estradiol que precedem a ovulação em

- 407 fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x
 408 Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). São Paulo, 2003, 98p. Dissertação
 409 (mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –
 410 Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo.
- 411 [6] Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in uterus in
 412 cattle. *Theriogenology* 1988; 29:21-37.
- 413 [7] Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles
 414 during the oestrus cycle of heifers. *J.Reprod. Fert.* 1988; 83:663-71.
- 415 [8] Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers
 416 monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 1988; 39:308-17.
- 417 [9] Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx J, Villeuve P, Dufour JJ. Synchronization of
 418 estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin.
 419 *Theriogenology* 1992; 38:1131-44.
- 420 [10] Thatcher WW, Drost M, Savio JD, Macmillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, De La
 421 Sota RL, Morris GR. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim.*
 422 *Reprod. Sci.*, 1993; 33:27-49.
- 423 [11] Pursley JR, Mee MO, Brown MD, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in
 424 dairy cattle using GnRH and PGF2 α . *J. Anim. Sci.*, 1994; 72:230.
- 425 [12] Barros CM, Moreira MBP, Fernandes P. Manipulação farmacológica do ciclo estral
 426 para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões.
 427 *Arq. Fac.Vet., UFRGS*, 1998; Supl.26:179-89.
- 428 [13] Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM Timed artificial insemination in beef
 429 cattle using GnRH agonist. PGF2 α and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 2001;
 430 55:1521–32.
- 431 [14] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in
 432 Nelore Breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*, 1997; 47:1489-1505.

- 433 [15] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal
434 treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical
435 climates. Anim. Reprod. Sci, 2004; 82-83:479-486.
- 436 [16] Marques MO, Sa Filho MF, Gimenes LU, Figueiredo TB, Sória GF, Baruselli PS.
437 Efeito do tratamento com PGF2 α na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do
438 dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção á inseminação artificial
439 em tempo fixo em novilhas nelore. Acta Scie. Veter., 2005; 33 (supl. 1): 287 (abstract).
- 440 [17] Baruselli PS, Madureira EH, Marques MO. Programas de IA al tiempo fijo en *Bos*
441 *indicus*. Segunda Parte. Taurus. 2001.
- 442 [18] Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of
443 early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x
444 *Bos Taurus*, and *Bos Taurus* heifers. Theriogenology, 2008; 69: 167-175.
- 445 [19] Bergfeld EGM, Kojima FN, Wehrman ME, Cupp AS, Peters KE, Mariscal V, Sanches
446 T, Kittok RJ, Garcia-Winder M, Kinder JE. Frequency of luteinizing hormone pulses
447 and circulating 17 β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of
448 progesterone comes from Esther na endogenous or exogenous source. An. Reprod.
449 Sci., 1995; 37: 257-265.
- 450 [20] Burke CR, Macmillan KL, Boland MP. Oestradiol potentiates a prolonged
451 progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. Anim.
452 Reprod. Sci., 1996; 45: 13-28.
- 453 [21] Callejas SS; Alberio R; Cabodevila J, Dulout F, Aller J, Catalano R, Teruel M.
454 Influence of different doses of progesterone treatments on ovarian follicle status in
455 beef cows. Anim. Reprod. Sci., 2006; 91:191-200.
- 456 [22] Cavalieri J, Rubio I, Kinder JE, Entwistle KW, Fitzpatrick LA. Synchronization of
457 estrus and ovulation and associated changes in *Bos indicus* cows. Theriogenology,
458 1997; 47: 801-814.

- 459 [23] Cutaia L., Tríbulo R, Moreno D, Bó GA. Pregnancy rates in lactating beef cows treated
460 with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic
461 gonadotropin (eCG). Theriogenology, 2003; 59: 216 (abstract).
- 462 [24] Lowmarn BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle: the east of
463 Scotland, vol. 6. Edinburgh: College of Agriculture; 1976. pp. 1–31 (Bulletin).
- 464 [25] SAS. Statistical Analylis System. SAS/STAT Users Guide, Release 9.1 Edition 2002.
465 Cary, NC, USA, SAS Inst., Inc.
- 466 [26] Blom E. The ultrastruture of some characteristics sperm defects and a proposal for a
467 new classification of the bull spermiogram. Nord Vet Med 1973; 25:383–91.
- 468 [27] Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Bazer FW, Drost M, Barron DH, Ficher KB, et al.
469 Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function
470 in cows. J Anim Sci, 1986;77:381–91.
- 471 [28] Carrière PD, Lee B. Direct radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using
472 danazol (17- α -2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as displacing agent.
473 Can J Vet Res, 1994; 58(3):230-3.
- 474 [29] Peres RFG. Efeito da concentração pré e pós ovulatória de progesterona em protocolos
475 de IATF em fêmeas Nelore. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina
476 Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.
- 477 [30] Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological
478 characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows.
479 Theriogenology, 2005; 63: 2382-94.
- 480 [31] Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP, Brito LFC. Follicular dynamics and
481 plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first
482 post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. Anim Reprod Sci , 2007; 98:189–
483 96.

- 484 [32] Lauderdale JW. Effects of PGF₂ on pregnancy and estrus cycle of cattle. J.Anim. Sci.,
485 1972; 35: 246 (Abstract).
- 486 [33] Vasconcelos JLM, Araújo TPB, Cerri RLA, Valarelli RL, Wedhsler FS. Ovulation and
487 synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows during two
488 seasons when receiving the PGF₂ α injection on D6 or 7 of the Ovsynch protocol. J.
489 Dairy Sci., 2000; 83: 214 (Abstract).
- 490 [34] Losi TC, Martins Junior AP, Meneghetti M, Vilela ER; Vasconcelos JLM. Protocolos
491 de sincronização da ovulação a base de progesterona e estradiol em vacas de corte
492 paridas: 1. Avaliação de diferentes doses de prostaglandina. 2004. In: Congresso
493 Brasileiro de Reprodução Animal. Anais... CD-ROOM (Abstract).
- 494 [35] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. Endocrine Reviews, 1991;
495 12: 1305-1319.