

Vinícius Gonçalves Pinheiro

Taxas de prenhez em vacas Nelore, em pós-parto recente, tratadas com protocolos hormonais à base de progesterona associados ou não a remoção temporária de bezerros (RTB) e ou eCG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
Co-orientadora: Profa. Dra. Luzia Aparecida Trinca

Botucatu – SP
2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado tão grande oportunidade e por ter me feito forte nos momentos mais difíceis e perseverante em meus objetivos;

À minha família: Gilberto, Lúcia Helena, Luis Gustavo, Renata e Eduardo. É impossível expressar em palavras o quanto eu os amo! Essa é mais uma de nossas vitórias!

À meus amigos e companheiros: Danilo Ferreira, Alfredo Ferrari, Marcelo Pegorer, Ronaldo Ereno, Benedicto Ferreira e Rafael Satrapa pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos e pela amizade verdadeira demonstrada;

Aos meus amigos e companheiros de Pós-Graduação: Alfredo Souza, Ana Cláudia Barcelos, André Mueller, Andrey Teixeira, Bruno Giorno, , Cláudia Carpinzaiki, Daniela Foltran, Danilas Melo, , Evandro Sartorelli, Érika, Fábio Monteiro, Luciano Mundim de Carvalho, Maicon Pinto, Marcelo Ferreira, Marcelo Nogueira, Marcelo Pegorer, Paulo Fernandes, Rafael Satrapa, Ronaldo Luiz Ereno, Walter Cavalcante e aos que aqui não foram mencionados):

obrigado pelas longas conversas, boas risadas e sobretudo, pela amizade;

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade criada e pelos momentos agradáveis durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu): Ana Cristina Murcia de Souza, Ana Maria Serafim, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni. Obrigado pela amizade e pelos bons momentos compartilhados!

Aos proprietários e funcionários das Fazendas Lageado do Varjão e Estância Rosalito, pelo fornecimento dos animais e pelo apoio;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho;

À minha avó, Tereza Gonçalves Pinheiro (in memorian): pelos conselhos e pelo exemplo de ser humano: seu caráter e integridade nunca serão esquecidos. Dedico essa vitória a senhora;

À minha tia, Carmem Lúcia Gonçalves Pinheiro Ginjo (in memorian): pela pessoa extrovertida e que mesmo nos momentos mais difíceis nunca desistiu de lutar. Também dedico essa vitória a você;

OBRIGADO

Ao meu orientador de Mestrado, Professor Dr. Ciro Moraes Barros:

exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar a resposta para a dúvida; mas, sobretudo, ensinou-me a ter paixão pela pesquisa.

OBRIGADO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1	1
Resumo	2
Introdução e objetivo	5
Revisão de literatura	10
Referências bibliográficas	24
CAPÍTULO 2	40
Abstract	42
Introduction	43
Material and methods	45
Location and animals	45
Semen and inseminator	46
Hormonal treatments	46
Figure 1	47
Ultrasonography and Radioimmunoassay	47
Statistical Analysis	48
Results	49
Table 1	49
Figure 2	50
Discussion	51
References	56

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micro grama;

µl – micro litro;

BE _ benzoato de estradiol

CL – corpo lúteo;

E₂ – estradiol;

eCG – gonadotrofina coriônica equina;

FSH – hormônio folículo – estimulante;

IATF – inseminação artificial em tempo fixo;

IM _ intramuscular

LH – hormônio luteinizante;

ml – mililitro;

PEPE - protocolo contendo **P**rogesterona – **E**strógeno – **P**rostaglândina - **E**strógeno

P4 – progesterona;

RTB – remoção temporária de bezerros;

UI – unidades internacionais;

US _ Exames ultrassonográficos dos ovários.

CAPÍTULO 1

Resumo

Introdução e Objetivo

Revisão de Literatura

Referências Bibliográficas

RESUMO

Existem relatos na literatura que tanto a remoção temporária de bezerro (RTB) como a administração de eCG podem aumentar a eficiência (taxa e prenhez) de tratamentos hormonais com progesterona/progestágenos, em vacas em anestro pós-parto. No presente trabalho a associação de RTB e/ou a aplicação de eCG foram testadas simultaneamente em protocolos hormonais com progesterona, comumente utilizado para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de vacas no período pós-parto. Os protocolos hormonais foram testados em 3 propriedades, em vacas Nelore lactantes (40 a 80d pós-parto, n = 443), com escore de condição corporal de 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5). Em estágio aleatório do ciclo estral (D0), os animais do grupo PEPE (Progesterona-Estrógeno-Prostaglandina-Estrógeno) receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB®, Sintex, Buenos Aires, Argentina) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brazil). Oito dias mais tarde (D8) administrou-se PGF2 α (150 μ g de d-cloprostenol, via IM, Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina), e o DIB foi removido. Vinte e quatro horas após a remoção do DIB, as vacas foram tratadas com BE (1,0 mg, IM) e 30 a 36 h mais tarde todos os animais receberam IATF, sem observação do cio. As vacas foram divididas ao acaso em 4 Grupos: PEPE, PEPE/RTB, PEPE/eCG e PEPE/RTB/eCG. No grupo PEPE/RTB, além do tratamento descrito acima (PEPE) os bezerros foram retirados das vacas por 54 – 60 h consecutivas (a partir da retirada do DIB até a IATF). No Grupo PEPE/eCG, os animais receberam o mesmo tratamento do grupo PEPE associado a uma aplicação de eCG (300 UI, via IM, Novormon®, Sintex, Buenos Aires, Argentina)

no momento da administração da PGF2 α (D8). No Grupo PEPE/RTB/eCG, os animais foram tratados de acordo com o protocolo PEPE/RTB associado a aplicação de eCG (300 UI) no D8. Em todos os grupos experimentais foi realizado exame ultra-sonográfico (Aloka SSD 500, probe de 7,5 MHZ) dos ovários, dez dias antes e no dia do início dos tratamentos hormonais, com a finalidade de verificar se os animais estavam em anestro (ausência de CL nos dois exames). O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a IATF, por meio de ultra-sonografia. Os dados foram analisados por meio de regressão logística. Foram consideradas no modelo, e não interferiram na taxa de prenhez, as variáveis: fazendas, dias pós-parto, presença de CL, inseminadores e sêmen (touros). Setenta e sete por cento (77%) dos animais estavam em anestro (ausência de CL) e as taxas de prenhez foram semelhantes ($p>0,05$) entre os 4 grupos: PEPE (54/108 = 50,0%), PEPE/RTB (44/106 = 41,5%), PEPE/eCG (63/116 = 54,3%) e PEPE/RTB/eCG (44/106 = 41,5%). Os resultados indicam que em vacas Nelore em anestro pós-parto, porém em boas condições corporais, a RTB e/ou aplicação de eCG não melhoraram a eficiência (taxa de prenhez) do protocolo PEPE.

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Os animais de raças zebuínas (subespécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al. 1999) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido a sua maior adaptação aos climas quentes e com alta umidade, maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (subespécie *Bos taurus taurus*). No Brasil, entre as raças de corte, a Nelore é a que possui o maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças), sendo considerada o alicerce da cadeia produtiva pecuária (ACNB, 2005).

A inseminação artificial pode trazer benefícios econômicos, em curto prazo, para a grande maioria dos pecuaristas. Entretanto, a carência de pessoal treinado e deficiências básicas de manejo nas propriedades têm limitado uma utilização mais ampla. Um dos principais fatores que determinam o sucesso de um programa de inseminação artificial (IA) é a detecção do cio, a qual requer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (cerca de 11 horas) 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, de forma a viabilizar a inseminação artificial com 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, 2000; Fernandes et al., 2001).

Dentre os inúmeros tratamentos hormonais testados para IATF de bovinos de corte, o protocolo com progesterona ou progestágenos tem se mostrado eficazes, principalmente no período pós-parto, quando boa parte dos animais se encontra em anestro (Bo et al., 1995; Cavallieri et al., 1997). O uso de dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (P4) associados à administração de benzoato de estradiol (BE) é um dos tratamentos mais utilizados para a IATF de bovinos (Macmillan & Burke, 1996; Bo & Baruselli, 2002; Bo et al., 2003). O tratamento mais usual consiste na administração de benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg, via IM) no momento da inserção do dispositivo (Dia 0), aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ quando o dispositivo intravaginal for removido (Dia 8) e 1,0 mg de BE (via IM) 24h mais tarde. A IATF é realizada 30-36 h após a última administração de BE. Portanto, neste protocolo são utilizados os seguintes hormônios: progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno (protocolo PEPE).

O protocolo PEPE tem sofrido modificações na tentativa de melhorar ainda mais o crescimento folicular e a sincronização da ovulação. Trabalhos recentes sugerem que no protocolo PEPE, logo após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a administração de eCG (400 UI, via IM, protocolo PEPE/eCG) tende a aumentar a taxa de prenhez de vacas em anestro pós-parto (Baruselli et al., 2003; Cutáia et al., 2003).

A eCG é uma gonadotrofina que estimula o crescimento folicular através de sua ação FSH e LH, aumenta a taxa de ovulação e concentração plasmática de progesterona no diestro do ciclo subsequente a IATF, proporcionando melhor desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação (Marques et al., 2003; Sá Filho et al., 2004). A eCG pode ser útil em vacas de corte amamentando, com baixa condição corporal (Roche et al., 1992) ou vacas tratadas precocemente no período pós-parto (Rossa, 2002) ou com alta incidência de anestro (Bó et al., 2003), porém talvez seja desnecessário em vacas ciclando ou com boa condição corporal (Kastelic et al., 1999).

Bó e colaboradores (1995), demonstraram que a associação de estrógenos a dispositivos que liberam progesterona/progestágeno promove atresia do folículo dominante e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular cerca de 4 dias após a aplicação destes esteróides (Bo et al., 1995, 2003). A regressão do CL é alcançada pela aplicação de estradiol no início do tratamento ou pela administração de PGF 2α no momento da remoção do implante. Esta possibilidade de sincronizar a onda de crescimento folicular por meio do uso concomitante de progesterona/progestágenos e estrógenos possibilitou o desenvolvimento de vários protocolos hormonais, especialmente úteis para realização de IATF em animais que se encontram em anestro e, portanto, não respondem bem a protocolos que não utilizam progesterona exógena (Bo et al., 2003; Barros & Ereno, 2004; Baruselli et al., 2005).

A remoção temporária de bezerros (RTB) tem sido utilizada como um artifício para incrementar as taxas de sincronização da ovulação em protocolos

de IATF. Diversos trabalhos têm mostrado o efeito benéfico da RTB para a retomada da atividade reprodutiva em vacas em anestro pós-parto (McNeilly, 1988, Yavas & Walton, 2000a, Barreiros et al., 2003). Meneghetti et al. (2001) verificaram que a remoção temporária dos bezerros (RTB) por 48 horas, aumentou o tamanho do folículo dominante, e a taxa de ovulação induzida por GnRH exógeno. Além disso, a RTB (48 horas) aumentou a taxa de prenhez de vacas Nelore em anestro pós-parto submetidas a protocolos com progesterona exógena. (Vasconcelos et al., 2004).

No presente trabalho objetivou-se testar se a utilização de eCG e/ou a remoção temporária de bezerros (RTB), melhorariam a taxa de prenhez de vacas Nelore em anestro pós-parto submetidas a tratamentos hormonais com progesterona exógena e inseminadas em tempo fixo.

REVISÃO DE LITERATURA

Dinâmica Folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induzem o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em todos os estágios da vida de uma fêmea, como no período anterior à puberdade (Adams et al., 1992) durante a gestação (Ginther et al., 1996b) e no pós-parto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a, b).

A dinâmica folicular dos bovinos de raças européias (*Bos taurus taurus*) é caracterizada pela presença de duas (Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989) ou três (Ireland & Roche, 1987; Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) ondas de crescimento folicular e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Murphy et al., 1990). Estudos realizados em bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore mostraram predominância de duas ondas de crescimento folicular para vacas e três ondas de crescimento folicular para novilhas (Barros et al., 1995; Figueiredo et al., 1997). Cada onda de crescimento folicular consiste na emergência simultânea de um grupo de 10 a 50 folículos com diâmetro de aproximadamente 2 a 3 mm, observados por ultrasonografia.

A emergência da onda folicular, também denominada de recrutamento folicular, é estimulada por um aumento transitório do hormônio folículo-estimulante-FSH (Fortune, 1993). Aproximadamente três dias após a

emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm, para *Bos taurus taurus* (Ginther et al., 1996a) e cerca de 6,1 mm para *Bos taurus indicus* (Sartorelli et al., 2005) ocorre o evento denominado de desvio ou divergência folicular (Ginther et al., 2001), quando um folículo continua a crescer e se torna o folículo dominante (FD), enquanto os demais folículos, denominados folículos subordinados, sofrem atresia (regressão). Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional e de níveis elevados de progesterona, esse primeiro FD não é capaz de induzir ao pico de LH, e nem provocar estro comportamental e ovulação (Fortune, 1993). Segundo Roberson et al. (1989), na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona há decréscimo na frequência de pulsos de LH. Desta forma, o FD perde dominância, sofre atresia e não ovula. Ao redor do décimo dia do ciclo estral ocorre a emergência da segunda onda de crescimento folicular e o processo se reinicia. O FD desta segunda onda regride, se houver três ondas de crescimento folicular, ou ovula se o ciclo estral for de duas ondas. (Ginther et al., 1989).

Nas raças européias (*Bos taurus taurus*) o estro dura cerca de 16 a 18 horas e a ovulação ocorre, em média, entre 28 e 30 horas após o início do estro (Galina; Artthur, 1990), ou seja, entre 10 a 12 horas após o final do estro (Hansel; Echternkamp, 1972). Por outro lado, em zebuínos, a receptividade sexual é, em média, de apenas 11 horas (Mukasa-Mugerwa, 1989; Galina; Arthur, 1990). Pinheiro et al. (1998), utilizando a técnica de ultra-sonografia, verificaram que o intervalo entre o início do estro e a ovulação era de $26,6 \pm 0,44$

horas e a duração do cio de aproximadamente 11 horas em vacas Nelore, com estro natural ou induzido por tratamentos hormonais. Estes resultados foram confirmados por Mizuta (2003) utilizando o sistema Heat-Watch para detectar o estro e a ultra-sonografia para observar a ovulação. Além dos zebuínos apresentarem estro de menor duração em relação às raças européias, existe uma elevada incidência de estro no período noturno (30 a 50%), o que dificulta ainda mais a detecção do estro nos zebuínos (Pinheiro et al., 1998).

O crescimento e a atresia folicular são influenciados por raça (Figueiredo et al., 1997), estágio reprodutivo (Roche & Boland, 1991), época do ano (Badinga et al., 1994), estresse calórico (Wilson et al., 1998), balanço energético (Rhodes et al., 1995) e escore da condição corporal (ECC) (Burke et al., 1998).

Anestro Pós-parto

O anestro pós-parto é o período que estende desde o parto até o aparecimento do primeiro estro, sendo caracterizado por ausência de manifestação estral. Neste período, também conhecido por puerpério, ocorre a involução uterina e o restabelecimento da atividade ovariana (Hafez, 2004). Sendo este o principal fator que contribui para o aumento do intervalo entre partos em bovinos de corte.

A amamentação e a nutrição são os principais fatores, mas outros fatores também contribuem para a duração do anestro pós-parto, entre eles pode-se

destacar a estação do ano, idade da vaca (número de partos), raça, presença de touros (Short et al., 1990), estresse, doenças, partos gemelares, distocia e retenção de placenta (Yavas & Walton, 2000a). Segundo Yavas & Walton (2000a), o período pós-parto seria o período de transição durante o qual a funcionalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal-uterino se recupera da gestação anterior.

A pulsatilidade e a concentração sanguínea de FSH aumentam logo após o parto, por volta do quarto dia (Williams et al., 1983) e posteriormente mantém padrão semelhante a vacas cíclicas (Williams et al., 1982). A secreção de FSH requer uma estimulação mínima de GnRH e sua liberação é controlada principalmente por efeito de retroalimentação dos esteróides ovarianos. Como a secreção de GnRH não é totalmente suprimida, a retomada precoce dos pulsos de FSH ocorre devido à baixa frequência inicial dos pulsos de GnRH, enquanto que, os pulsos de LH reiniciam relativamente mais tarde no pós-parto, quando a frequência dos pulsos de GnRH aumenta (Lamming et al., 1981). O padrão pulsátil de liberação do LH pós-parto se caracteriza por baixa frequência, menos de um pulso de LH a cada quatro horas (Williams et al., 1983). Essa frequência aumenta durante o período imediatamente anterior a ovulação até aproximadamente um pulso de LH a cada uma ou duas horas (Schallenberger & Prokopp, 1985).

O peptídeo Kiss produzido nos núcleos hipotalâmicos anteroventral e paraventricular, através de estímulos de esteróides ovarianos, são responsáveis por intermediar a liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em

decorrência de um aumento de estradiol na fase final do ciclo estral o que culminará com o pico pré-ovulatório de LH (Smith et al., 2006)

Nas primeiras três semanas após o parto ocorre o início do crescimento de ondas foliculares, a involução uterina e a reposição dos estoques hipofisários de LH. A liberação de FSH e o desenvolvimento do FD iniciam logo após o parto, porém esses folículos não atingem a maturação final, um pré-requisito para a ovulação, devido a ausência de pulsos apropriados de LH, desta forma, os folículos tornam-se atrésicos (Yavas & Walton, 2000a).

Primeira ovulação pós-parto, luteólise e ciclo curto

A formação do primeiro FD ocorre geralmente de dez a doze dias pós-parto em vacas de corte e de leite (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a; Stagg et al., 1995). Em vacas de corte com bezerro ao pé a ciclicidade geralmente é restabelecida dentro de 35 a 60 dias pós-parto em animais que apresentam ECC adequados, podendo este período se estender em condições desfavoráveis (Yavas & Walton, 2000b). Na grande maioria das vezes a primeira ovulação pós-parto ocorre sem a manifestação de estro (Savio et al., 1990a; Murphy et al., 1990; Looper et al., 1997), devido ao fato da capacidade do FD, em produzir estradiol, está limitada durante o período de anestro pós-parto (Spicer et al., 1986).

Em vacas de corte com bezerro ao pé observou-se que apenas 10% dos animais ovularam o FD da primeira onda de crescimento folicular (Murphy et al.,

1990) e a maior parte dos animais apresentam várias ondas de crescimento folicular antes da primeira ovulação (Stagg et al., 1995; Henao et al., 2000).

Geralmente a primeira ovulação pós-parto é seguida por um ciclo estral curto e não é precedida pela manifestação de estro em 80 a 90% das vacas de corte (Stagg et al., 1995). A fase luteal, após a primeira ovulação pós-parto geralmente tem duração de 8 a 12 dias, independente se foi espontânea (Looper et al., 1997) ou induzida por desmame precoce, GnRH ou hCG (Short et al., 1990). O ciclo curto é composto por uma única onda de crescimento folicular, CL de diâmetro menor e baixas concentrações circulantes de progesterona quando comparado ao ciclo estral normal (Yavas & Walton, 2000b).

Stagg et al. (1998) observaram a ocorrência de ciclos curtos (< 16 dias) após a primeira ovulação em 85% das vacas, enquanto que 12% das vacas tiveram ciclos de duração normal (18-24 dias) e 3% de ciclos longos (>24 dias). Quando compararam vacas inseminadas na primeira ovulação pós-parto com vacas inseminadas após o primeiro estro precedido de um ciclo curto, observaram taxas de concepção de 41 e 76% ($p < 0,05$), respectivamente.

Em bovinos e ovinos a lise do corpo lúteo é causada pela liberação de prostaglandina F₂α (PGF₂α) endometrial no final da fase luteal, dando origem a um novo ciclo estral (Horton & Poyser, 1975). O sinal hormonal que leva à liberação de PGF₂α em quantidades luteolíticas é o estradiol proveniente dos folículos ovarianos. McCracken et al., (1984) propuseram que o estradiol age estimulando a síntese de receptores para ocitocina no endométrio de ovelhas, e

que a ocitocina, proveniente do corpo lúteo ou da neuro-hipófise, estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta hipótese foi confirmada por trabalhos que demonstram a síntese de ocitocina pelo corpo lúteo bovino (Wathes et al., 1983, 1984) e sua interação com receptores endometriais próprios (Fuchs et al., 1990) estimulando desta forma a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo tecido endometrial, tanto “in vivo” (Putney et al., 1989) quanto “in vitro” (Gross et al., 1988).

A regressão prematura do CL, após a primeira ovulação pós-parto, ocorre devido a liberação precoce de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio uterino, devido a maior concentração de receptores de ocitocina neste local em animais que apresentam ciclo curto. A exposição previa a altos níveis de progesterona inibe o número dos receptores de ocitocina no endométrio e previne o ciclo curto (Zoolers et al., 1993). Acredita-se que, após o parto, as vacas necessitem de um primeiro contato com a progesterona (“priming”) para que se desenvolva um corpo lúteo com vida funcional normal (Hunter, 1991; Garverick et al., 1992; Yavas & Walton, 2000b).

Mais recentemente, Mann & Lamming (2000) propuseram que a vida curta do primeiro CL pós-parto está relacionada ao fato do folículo dominante não se desenvolver o suficiente para produzir elevadas concentrações de estradiol, que seriam responsáveis pela diminuição (“down regulation”) dos receptores do próprio estradiol no endométrio uterino. Se houver disponibilidade de receptores no endométrio uterino, a interação do estradiol com os mesmos desencadeará a síntese de receptores de ocitocina no endométrio que, ao

interagirem com a ocitocina, resultarão na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio uterino e lise prematura do corpo lúteo.

O escore de condição corporal da vaca na parição é correlacionado positivamente com o desenvolvimento folicular precoce no período pós-parto (Ryan et al., 1994), conteúdo pituitário de LH aos 30 dias pós-parto (Connor, et al., 1990) e frequência dos pulsos de LH (Bishop et al., 1994). O metabolismo basal, o crescimento e as reservas basais de energia têm prioridade aos processos reprodutivos, como o início da ciclicidade e o estabelecimento e manutenção da prenhez (Short et al., 1990).

Remoção Temporária de Bezerros (RTB)

A remoção temporária de bezerros tem sido utilizada como um artifício para incrementar as taxas de sincronização da ovulação em protocolos de IATF.

Stagg et al. (1998) sugeriram que o comportamento maternal é mais importante que o ato da sucção em si para regular a frequência de pulsos de LH. A percepção inguinal do bezerro pela vaca durante a sucção, aumenta a sensibilidade do centro gerador de pulsos de GnRH no hipotálamo ao efeito de retroalimentação negativa do 17β -estradiol ovariano, pela liberação de peptídeos de ópioides endógenos pelo hipotálamo (Stevenson et al., 1994), ocasionando a supressão da liberação de pulsos de LH, falha no desenvolvimento final do FD e da ovulação, proporcionando a manutenção do

anestro pós-parto. O efeito supressivo da amamentação parece influenciar a duração do período pós-parto do momento em que os estoques de LH hipofisário se recompõem (15 a 30 dias pós-parto) até aproximadamente 45 dias pós-parto. O desmame ou as interrupções temporárias da amamentação possuem pouca influência sobre o intervalo pós-parto quando praticadas fora desse período (Yavas & Walton, 2000b).

Williams et al., (1983) verificaram aumento nos pulsos de LH em vacas que tiveram os bezerros removidos por 48 horas comparadas àquelas que ficaram juntas com seus bezerros ($3,0 \pm 0,6$ vs. $1,2 \pm 0,3$ pulsos em 6 horas, respectivamente).

Meneghetti et al., (2001) observaram que a RTB por 48 horas proporcionou aumento do maior folículo ovariano, e por sua vez o diâmetro do maior folículo influenciou a taxa de ovulação nos animais que sofreram estímulo exógeno (GnRH) para ovulação (85,4 vs. 51,0%, para os grupos com ou sem RTB, respectivamente). Quintans & Vazquez (2002), relataram taxa de ovulação de 33% (n = 9) e 66% (n = 9) após RTB por 96 h e 144 h, respectivamente. A RTB, juntamente com a administração de GnRH, foi eficiente em induzir a ovulação (100%, n=12).

Vasconcelos et al. (2004) utilizaram a RTB, em vacas Nelore lactantes, antes da inserção do implante intravaginal de progesterona e da primeira aplicação de GnRH (D0) e voltaram a utilizar a RTB após a retirada do implante (D7) até o momento da IATF e segunda dose de GnRH (D9). Observaram interação ($p < 0,05$) entre ciclicidade e a RTB; nas vacas ciclando a RTB diminui

a taxa de concepção (29,9% vs. 61,0%). Porém, nos animais em anestro pós-parto a RTB melhorou a taxa de concepção (53,8% vs. 35,3%).

A condição corporal (Albeiro et al., 1984), a idade dos bezerros no ato da separação (Bonavera et al., 1990) e o estágio do desenvolvimento folicular (Sinclair et al., 2002) são fatores que estão envolvidos na variabilidade de resposta da remoção temporária dos bezerros.

Sincronização da onda de crescimento folicular com protocolos a base de progesterona/progestágenos.

A ação da progesterona na sincronização do ciclo estral em bovinos tem sido relatada há décadas (Lamond, 1964; Gordon, 1976). Os animais recebiam doses diárias de progesterona por períodos de até 20 dias. Estes tratamentos resultavam em altas taxas de sincronização do estro, no entanto apresentavam baixa fertilidade, além de serem pouco práticos (Macmillan e Peterson, 1993). Com o passar do tempo foram desenvolvidos métodos mais práticos de administração de progesterona com a utilização de dispositivos (intravaginais ou auriculares) liberadores de progesterona/progestágenos (Bo et al., 2003; Barros & Ereno, 2004; Baruselli et al 2004).

As concentrações de progesterona/progestágenos liberadas pelos dispositivos, estão abaixo das encontradas na fase luteal, o que permite aumento na pulsatilidade de LH, ocasionando maior crescimento do folículo dominante e conseqüentemente maior produção de estradiol, resultando na

ovulação do mesmo em 75 a 100% das vacas, após a retirada do dispositivo (Savio et al., 1993; Fortune, 1994; Yavas & Walton, 2000a). Anderson & Day (1998) propuseram que a exposição à progesterona reduz a concentração de receptores de E2 no hipotálamo, amenizando a retroalimentação negativa sobre a liberação de GnRH, possibilitando aumento na secreção de LH.

A exposição à progesterona, mesmo por curtos períodos de tempo (7 a 10 dias), na ausência de um CL pode resultar em reduzida fertilidade pela ocorrência de folículos persistentes (Austin et al., 1999). Portanto, é necessário induzir a atresia ou a ovulação do folículo dominante presente no ovário, no momento da colocação do dispositivo, o que pode ser obtido pela administração de estradiol ou GnRH (Bo et al., 2003).

Bó e colaboradores (1995, 2003) demonstraram que a associação de estrógenos a dispositivos que liberam progesterona/progestágeno promove atresia do folículo dominante e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular cerca de 4 dias após a aplicação destes esteróides. A regressão do CL é alcançada pela aplicação de estradiol no início do tratamento ou pela administração de PGF₂ α no momento da remoção do implante. Esta possibilidade de sincronizar a onda de crescimento folicular, por meio do uso concomitante de progesterona/progestágenos e estrógenos, possibilitou o desenvolvimento de vários protocolos hormonais, especialmente úteis para realização de IATF em animais que se encontram em anestro e, portanto, não respondem bem a protocolos que não utilizam progesterona exógena (Bo et al., 2003; Barros & Ereno, 2004;; Baruselli et al., 2005).

Uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) em protocolos para IATF

A eCG é uma gonadotrofina glicoprotéica produzida pela placenta de eqüídeos durante a gestação (Combarnous, 1992). Entre os dias 25 e 35 da gestação da égua, células do trofoblasto formam um tecido avascularizado chamado de cinta coriônica que circunda o concepto. No dia 35 essas células passam a invadir o endométrio uterino e em 48 horas formam-se estruturas de 0,5 a 1,0 cm chamadas de cálices endometriais (Ginther, 1996b). As células da cinta coriônica passam a secretar o eCG, aproximadamente, do dia 33 ao 120 da gestação (Mcdowell; Adams; Baker, 1993).

A eCG apresenta em sua estrutura duas cadeias (α e β), sendo a α idêntica em todas as gonadotrofinas existentes (96 aminoácidos), e a β diferente entre elas (149 aminoácidos), sendo esta última responsável pela ação de cada gonadotrofina (Combarnous, 1992). Na égua a eCG estimula a formação das glândulas luteais acessórias para auxiliarem na manutenção da gestação (Lunn; Vagnani; Ginther, 1996).

Quando administrada em outras espécies, a eCG se liga aos receptores de FSH ou de LH, sendo a única gonadotrofina capaz de ligar-se simultaneamente aos receptores de LH e FSH em mamíferos, exceto nos eqüídeos (Murphy; Martinuk, 1991). 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 apud Kuran; Hutchinson; Broadbent, 1996, P. 10).

A eCG estimula o crescimento folicular mediante a sua ação FSH e LH, aumenta a taxa de ovulação e a concentração plasmática de progesterona no diestro do ciclo subsequente a IATF, por se ligar aos receptores de LH no CL (Stewart; Allen, 1981), proporcionando melhor desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação (Marques et al., 2003; Sá Filho et al., 2004). Cavalieri et al. (1997) observaram melhor sincronização da ovulação, quando administraram 400 UI de eCG na retirada do implante de norgestomet. De forma semelhante, Sá Filho et al. (2004) verificaram que o uso da eCG em protocolos de IATF, após a retirada do implante auricular de progestágeno, aumenta o diâmetro máximo do folículo dominante, além de aumentar as taxas de ovulação e concepção.

A utilização da eCG em programas de IATF pode ser útil em vacas de corte amamentando, com baixa condição corporal (Roche et al., 1992), vacas tratadas precocemente no período pós-parto (Rossa, 2002), com alta incidência de anestro (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004), mas pode ser desnecessário em vacas ciclando ou com boa condição corporal (Kastelic et al., 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.**, Cambridge, v.94, p.177-88, 1992.

ALBEIRO, R.H., BUTLER, H.M., PALMA, G., SCHIERSMANN, G., ALGORTA, D., ORTIZ, A. Reproductive behaviour and fertility after a temporary weaning in multiparous beef cows with different body condition. **Rev. Arg. Prod. Anim.**, v.4 (5), p.555–566, 1984.

ANDERSON, L.H., DAY, M.L. Development of a progestin-based estrus synchronization program: Reproductive response of cows fed melengestrol acetate for 20 days with an injection of progesterone. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1267-1272, 1998.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL – ACNB, 2005, acesso 10/07/2006, <http://www.nelore.org.br>.

AUSTIN J.E., MIHM M., RYAN M.P., WILLIAMS D.H., ROCHE J.F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2219-26, 1999.

BADINGA, L., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J., MORRIS, G., ENTWISTLE, K., WOLFENSON, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17 β , progesterone and luteinizing in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v.42, n. 8, p.1263-1274, 1994.

BARREIROS, T.R.R., SENEDA, M.M., BALARIN, O.F., REIS, E.L., BARUSSELI, P.S., PEGORER, M., ERENO, R.L., BARROS, C.M. Effect of

temporary calf removal on synchronization of ovulation for fixed timed artificial insemination. **Act. Sci. Vet.**, supl.31, p.238-239, 2003.

BARROS, C.M., ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Act. Sci. Vet.**, supl.32, p.23-34, 2004. .

BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Ver. 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. **Act. Sci. Vet.**, UFRGS, supl. 26, p.179-89, 1998.

BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FIGUEIREDO, A.R., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF 2α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.53, p.1121-1134, 2000.

BARUSELLI, P.S., BO, G.A., REIS, E.L., MARQUES, M.O., SÁ FILHO, M.F. Introduction de la IATF em el manejo reproductivo de rebaños de ganado de engorde em Brasil. **Congreso Internacional de Reproducción Bovina**, Bogotá – Colombia, p.125-127, 2005.

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.

BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.479-486, 2004.

BISHOP, G.M.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.2703-2708, 1994.

BO, G.A., ADAMS, G.P., CACCIA, M., MARTINEZ, M., PERSOM, 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.; BARUSELLI, P.S.; Programas de inseminacion artificial a tiempo fijo en la ganada bovino en regions subtropicales y tropicales. In: Gonzáles-Stagnaro, C, Belloso, E.S., Iglesia, L.R.(Org). **Avances en la ganadería de doble propósito**, Maracaibo – Venezuela, v.1, p.497-514, 2002.

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

BONAVERA, J.J., SCHIERSMANN, G.C.S., ALBERIO, R.H., MESTRE, J. A note on the effects of 72-hour calf removal and/or bull exposure upon postpartum reproductive performance of Angus cows. **Anim. Prod.**, v.50, p.202–206, 1990.

BURKE, J.M., HAMPTON, J.H., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. Body condition influences maintenance of a persistent first wave dominant follicle in dairy cattle. **Theriogenology**, New York, v.49, n.4, p.751-760, 1998.

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

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.

CONNOR, H.C., HOUGHTON, P.L., LEMENAGER, R.P., MALVEN, P.V., PARFET, J.R., MOSS, G.E. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropins-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.7, p.403-411, 1990.

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

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.1489-505, 1997.

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.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225–232, 1994.

FUCHS, A.R., BEHRENS, O., HELMER, H. et al. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrus cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v.127, p.629-36,1990.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H., Review on cattle reproduction in the tropics. Part4. Oestrus cycles. **Anim. Breed.**, v.58, p.697-707, 1990. (abstract)

GARVERICK, H.A., ZOLLERS, W.G., SMITH, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.111-124, 1992.

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, 2001.

GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fert.**, v.887, p.223-30, 1989.

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

GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., MARTIN, S., WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.

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

GORDON, I. Controlled breeding in cattle. Part.1. Hormones in the regulation, oestral control, and set-time artificial insemination. **Anim. Breed.**, v.44, p.265-75, 1976. (abstract)

GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. et al. Prostaglandin secretion by perfused bovine endometrium: secretion towards the myometrial and luminal sides at day 17 post-estrus as altered by pregnancy. **Prostaglandins**, v.35, p.342-57, 1988.

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animal. 6. ed. **Philadelphia**, Lea & Febiger, 585p, 1993.

HANSEL, W., ECHTERNKAMP, S.E. Control of ovarian functions in domestic animals. **Am. Zool.**, v.12, p.225-43, 1972.

HENAO, G., OLIVEIRA-ANGEL M., MALDONADO, J.G. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.63, p.127-136, 2000.

HORTON, E.W., POYSER, N.L. Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F_{2α}. **Physiol. Rev.**, v.56, p.595, 1975.

HUNTER, M.G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, p.91-99, 1991.

IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche J.F., O' Callaghan, D. (Eds) Boston: **Martinus Nijhoff Publishers**, MA, p.1-18, 1987.

KASTELIC, J.P., OLSON, W.O., MARTINEZ, M.A., COOK, R.B., MAPLETOFT, R.J. Synchronization of estrous in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Canad. Vet. J.**, v.40, p.173-8, 1999.

KNOFF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.6, p.111-19, 1989.

KURAN, M., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v.45, n.1-2, p1-12, 1996.

LAMMING, G.E., WATHES, D.C., PETERS, A.R. Endocrine patterns in the postpartum cow. **J. Reprod. Fert.**, v.30, p.155-170, 1981.

LAMOND, D.R. Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. **Anim. Breed.**, v.32, p.269-285, 1964. (abstract)

LOOPER, M.L., LENTS, C.A., VIZCARRA, J.A., WETTEMANN, R.P. Evaluation of the effects of body condition on luteal activity and estrus in postpartum beef cows. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.74, n. 1, p.223, 1997. (abstract)

LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3615-26, 1992.

LUNN, P., VAGNANI, K.E., GINTHER, O.J. The equine response to endometrial cups. **J. Reprod. Immunol.**, v.34, n. 3, p.203-216, 1996.

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

MACMILLAN, K.L., PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone realising device for cattle (CIDR - B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.1-25, 1993.

MANN, G.E., LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Anim. Reprod. Sci.**, v.64, p.171-180, 2000.

MARQUES, M.O., REIS, E.L., CAMPOS FILHO, E.P., BARUSELLI, 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, pp. 392, 2003. (abstract)

MCCRACKEN, J.A., SCHRAM, W., OKULICZ, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p.31-56, 1984.

MCDOWELL, J.A., ADAMS, M. H., BAKER, C.B. Chorionic gonadotropin α and β subunit RNA's are present in equine placental membrane by day 30 of pregnancy. **J. Equi. Vet. Sci.**, v.13, n.3-4, p.515-518, 1993.

MCNEILLY AS. Suckling and the control of gonadotropin secretion. in: knobil e, neill j (eds), **The physiol. Reprod.**, New York: raven press, p.2323-2349, 1988.

MEIRELLES, F.V., ROSA, A.J.M., LÔBO, B.R. Is the American Zebu really *Bos indicus* ? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-547, 1999.

MENEGHETTI, M., VILELA, E.R., VASCONCELOS, J.L.M. et al. Efeito da remoção dos bezerros nos folículos dominante e na taxa de ovulação ao primeiro GnRH em protocolos de sincronização em vacas Nelore em anestro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.3, p.286-288, 2001.

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

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

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

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. Fert.**, v.90, p.523-33, 1990.

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., MEE, M.O.K., 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.

PUTNEY, D.J., TORRES, C.A.A., GROSS, T.S. et al. Modulation of uterine prostaglandin biosynthesis by pregnant and nonpregnant cows at day 17 post-estrus in response to in vivo and in vitro heat stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.20, p.31-47, 1989.

QUINTANS, G., VÁZQUEZ, A.I. Effect of premature weaning and suckling restriction with nose plates on the reproductive performance of primiparous cows under range conditions. In: Proceedings of the **Sixth International Symposium in Domestic Ruminants**, Crieff-Scotland, p.14–17, A65, 2002.

(abstract)

RHODES, F.M., FITZPATRICK, L.A., ENTWISTLE, K.W., DEATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **J. Reprod. Fert.**, Cambridge, v.104, n. 1, p.41-49, 1995.

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.

ROCHE, J.F., BOLAND, M.P. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. **Theriogenology**, New York, v.35, n.1, p.81-90, 1991.

ROCHE, J.F., CROWE, M.A., BOLAND, M.P. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.371-8, 1992.

ROSSA, L.A.F. **Sincronização da ovulação por eCG ou benzoato de estradiol em vacas de corte tratadas com Crestar no período pós-parto.** São Paulo, 2002. 80 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

RYAN, D.P., SPOON, R.A., GRIFFITH, M.K., WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body conditions maintained during the puerperium. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.11, p.161-174, 1994.

SÁ FILHO, M.F., REIS, E.L., VIEL JR, J.O., NICHI, 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.32, p.235, 2004.

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**, New York, v.63, p.2382-2394, 2005.

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., ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.581-591, 1990b.

SAVIO, J.D., TATCHER, W.W., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.197–203, 1993.

SCHALLENBERGER, E., PROKOPP, S. Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. IV. Re-establishment of the stimulatory feedback action of oestradiol-17-beta on LH and FSH. **Act. Endocrinol.**, v.109, p.44–49, 1985.

SHORT, R.E., BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., BERARDINELLI, J.G., CUSTER, E.E., Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.68, p.799-806, 1990.

SINCLAIR, K.D., MOLLE, G., REVILLA, R., ROCHE, J.F., QUINTANS, G., MARONGUI, L., SANZ, A., MACKEY, D.R., DISKIN, M.G. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. **Anim. Sci.**, v.75, p.115–126, 2002.

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.

SMITH, J.T., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Regeneration of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Anim. Reprod. Sci.**, v.131, p.623-630, 2006.

SPICER, L.J., LEUNG, K, CONVERY, E.M., GINTHER, J., SHORT, R.E., TUCKER, H.A. Anovulation in postpartum suckled beef cows. I. Associations among size and numbers of ovarian follicles, uterine involution, and hormones in serum and follicular fluid. **J. Anim. Sci.**, v.62, p.734-741, 1986.

STAGG, K., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M., ROCHE, J.F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.49-61, 1995.

STAGG, K., SPICER, L.J., SREENAN, J.M., ROCHE, J.F., DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.777-783, 1998.

STEVENSON, J.S., KNOPPEL, E.L., MINTON, J.E., SALFEN, B.E. and GARVERICK, H.A. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced

hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.690-699, 1994.

STEWART, F., ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil.**, v.62, n.2, p.527-536, 1981.

THATCHER, W.W., DROST, M., SAVIO, J.D., MACMILLAN, K.L., ENTWISTLE, K.W., SCHIMITT, 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.

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.

VASCONCELOS, J.L.M., PEREZ, G.C., SANTOS, R.M., SA FILHO, O.G. Effects of progesterone intravaginal device and calf removal on conception in suckled Nelore cows. In: **15Th International Congress on Animal Reproduction**, v.15, p.120, 2004. (abstract).

WATHES, D.C., SWANN, R.W., BIRKETT, S.D. et al. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.113, p.693-8, 1983.

WATHES, D.C., SWANN, R.W., PICKERING, B.T. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine corpus ovary during the oestrous cycle and pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.71, p.551-7, 1984.

WILLIAMS, G.L., KOTWICA, J., SLANGER, W.D., OLSON, D.K., TILTON, J.E., JOHNSON, L.J. Effect of suckling on pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone throughout the early postpartum period of beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.54, p.592–602, 1982.

WILLIAMS, G.L., TALAVERA, F., PETERSEN, B.J., KIRSCH, J.D., TILTON, J.E. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. **Biol. Reprod.**, v.29, p.362–373, 1983.

WILSON, S.J., MARION, R.S., SPAIN, J.N., SPIERS, D.E., KEISLER, D.H., LUCY, M.L. effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.81, n.8, p.2124-2131, 1998.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v.54, p.1-23, 2000a.

YAVAS, Y., WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v.54, p.25-55, 2000b.

ZOOLERS, W.G. JR., GARVERICK, H.A., SMITH, M.F. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.329-337, 1993.

CAPÍTULO 2

Pregnancy rates in Nelore cows, in early postpartum, treated with hormonal protocols with progesterone associated or not to temporary calf removal (TCR) and/or eCG administration

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na Theriogenology, exceto a apresentação das figuras.

Pregnancy rates in Nelore cows, in early
postpartum, treated with hormonal protocols with
progesterone associated or not to temporary calf
removal (TCR) and/or eCG administration

Running title:

Pregnancy rates after fixed-time AI protocols

Vinícius G. Pinheiro¹, Alfredo F. Souza¹, Marcelo F. Pegorer², Luzia A. Trinca³, Ciro M.
Barros^{1a}

*Department of Pharmacology¹, Department of Biostatistics³ - IB, Department of Animal
Reproduction² - FMVZ, University of Sao Paulo State (UNESP), 1868-000, Botucatu, Sao
Paulo, Brazil.*

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

Abstract

Reports indicate that either TCR or eCG administration can increase the efficiency (pregnancy rate) of hormonal treatments with progestins during postpartum anestrus. This experiment evaluated effects of TCR and/or eCG administration in a protocol with progesterone that is frequently used for fixed-time artificial insemination (FTAI) in cows during postpartum anestrus. The protocols were tested at three farms in lactating Nelore cows (40 to 80 d postpartum, n = 443) with body condition scores from 2.5 to 3.0 (0- to 5-point scale). At random stage of the estrous cycle (D0), animals received a basic PEPE (Progesterone-Estrogen-Prostaglandin-Estrogen) protocol with insertion of an intravaginal device with progesterone (1.0 g, DIB®, Sintex, Buenos Aires, Argentina) and injection of 2.5 mg of estradiol **benzoate** (EB, i.m., Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brazil). Eight days later (D8) cows were treated with PGF₂; (150 µg d-cloprostenol, i.m., Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina), and DIB was removed. Twenty four hours after DIB removal, cows received EB (1.0 mg, i.m), and 30 to 36 h later all animals received FTAI, without estrus detection. Cows were allocated randomly to 4 Groups: PEPE, PEPE/TCR, PEPE/eCG and PEPE/TCR/eCG. In Group PEPE/TCR, calves were removed temporarily for 54 – 60 h (from DIB removal until FTAI). In Group PEPE/eCG, animals received PEPE treatment plus one dose of eCG (300 IU, i.m., Novormon®, Sintex, Buenos Aires, Argentina) following PGF₂ administration (D8). In Group PEPE/TCR/eCG, animals were treated as in protocol PEPE/TCR plus eCG on D8. All animals were examined by ultrasonography (Aloka SSD 500, 7.5 MHZ probe) 10 days before and at the beginning of

hormonal treatment, in order to detect anestrous cows (absence of CL in both exams). Pregnancy diagnosis was performed 30 days after FTAI, by ultrasonography. The data were analyzed by logistic regression. The following variables were considered in the model and did not affect pregnancy rates: farms, postpartum days, presence of CL, inseminators, and semen (sire). Seventy seven percent (77%) of the animals were in anestrus (absence of CL) and the pregnancy rates were similar ($p>0.05$) among the 4 groups: PEPE (54/108 = 50.0%), PEPE/TCR (44/106 = 41.5%), PEPE/eCG (63/116 = 54.3%), and PEPE/TCR/eCG (49/113 = 43.4%). The results indicated that in Nelore cows, in postpartum anestrus, and good body conditions, TCR and/or eCG administration do not improve the efficiency (pregnancy rate) of protocol PEPE.

Key words: artificial insemination, progesterone, bovine, eCG, temporary calf removal,

1. Introduction

Zebu cattle (Bos taurus indicus) is predominant in Brazil and other tropical and subtropical regions. The short duration of estrous behavior (11 h), associated with high incidence of estrus at night (30 to 50%) makes it difficult to detect heat in Nelore females [1]. The characterization of bovine follicular dynamics by ultrasonography [2,3,4,5] provided the rational basis for pharmacological manipulation of the estrous cycle in order

to synchronize ovulation and allow AI at a predetermined time without regard to estrous behavior.

Among the numerous treatments tested for FTAI in beef cattle, the protocols with progestins have been shown to be efficacious, principally in the postpartum period when most animals are found in anestrus [6,7]. The use of progesterone-releasing intravaginal device (P4) associated with administration of EB has been extensively used in FTAI protocols [8,9,10]. Usually it consists in administration of estradiol benzoate (EB; via i.m.) at the time of insertion of the device (Day 0), application of PGF₂ at the time of intravaginal device removal (Day 7 or 8) and 1.0 mg of EB (via i.m.) 24h later. The FTAI is carried out 30-36 h after the last administration of EB. Therefore, in this protocol the following hormones are utilized: progesterone-estrogen-prostaglandin-estrogen (protocol PEPE).

The PEPE protocol has undergone modifications in an attempt to further improve follicular growth and the synchronization of ovulation. Recent works suggest that in the PEPE protocol, soon after the application of PGF₂, the administration of eCG (400 IU, via im, protocol PEPE/eCG) tends to increasing pregnancy rate of cows in postpartum anestrus [11,12].

The eCG is a gonadotrophin that stimulates follicular growth through its FSH and LH action, increases the ovulation rate and plasmatic concentration of progesterone in diestrus stage of the cycle subsequent to FTAI, providing better embryonic development and maintenance of pregnancy [13,14]. The eCG can be useful in suckling beef cows, with poor body condition [15] or treated in the early postpartum period [16] or with high incidence of

anestrus [10]. However, it may not be necessary in cycling cows or those with good body condition [17].

The temporary calf removal (TCR) has been utilized as an attempt to improve synchronization of ovulation in FTAI protocols. Several studies have shown the beneficial effect of TCR for the recovery of reproductive activity of cows in postpartum anestrus [18,19,20]. Meneghetti et al. [21] verified that TCR for 48 h, increased the size of the dominant follicle, and the ovulation rate induced by exogenous GnRH. Furthermore, TCR (48 hours) increased the pregnancy rate in Nelore cows in postpartum anestrus submitted to FTAI protocols with exogenous progesterone [22].

The present work aimed to test whether the utilization of eCG and/or the temporary calf removal, improves the pregnancy rate in Nelore cows, in early postpartum, submitted to hormonal treatments with exogenous progesterone and inseminated at a fixed time.

2. Materials and methods

2.1. Location and Animals

The experiments were carried out in Piraju (n = 238, farm A), Espirito Santo do Turvo (n = 105, farm B) and Santa Cruz do Rio Parto (n = 100, farm C) in the central-west region of the state of Sao Paulo, Brazil (latitude 23° 11'S, longitude 49° 23'W) on three private farms, during the breeding season in 2004. Nelore cows (n = 443, 40 to 80 days postpartum) were maintained on pasture (Brachiaria decumbens or Brachiaria brizantha) with *ad libitum* mineral salt supplementation and had body condition scores from 2.0 to 3.5

(0- to 5- point scale; [23]). Eighty four cows were primiparous and the rest of them (360) were multiparous. The animals were in a positive energetic balance.

2.2. Semen and Inseminator

The FTAI were carried out on farms A and B, and on C for two and one inseminators, respectively. On farm A were utilized semen from three bulls of the breeds Nelore and Red Angus, on farm B semen from two Red Angus bulls, and on farm C semen from two bulls, one Guzera and one Simental. The semen was evaluated morphologically [24] and motility and distributed homogenously among the experimental groups.

2.3. Hormonal treatments

At random stage of the estrous cycle (D0), animals received a basic PEPE (Progesterone-Estrogen-Prostaglandin-Estrogen) protocol with insertion of a progesterone intravaginal device (1.0 g, DIB®, Sintex, Buenos Aires, Argentina) and injection of 2.5 mg of estradiol benzoate (EB, i.m., Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brazil). Eight days later (D8) cows were treated with PGF2 (150 µg d-cloprostenol, i.m., Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina), and DIB was removed. Twenty four hours after DIB removal, cows received EB (1.0 mg, i.m), and 30 to 36 h later all animals received FTAI, without estrus detection (Figure 1).

Cows were allocated randomly to 4 Groups: PEPE, PEPE/TCR, PEPE/eCG and PEPE/TCR/eCG. In Group PEPE/TCR, calves were removed temporarily for 54 - 60 h [from DIB removal until FTAI (Figure 1)].

In Group PEPE/eCG, animals received PEPE treatment plus one dose of eCG (300 IU, i.m., Novormon®, Sintex, Buenos Aires, Argentina) following PGF2 administration [D8 (Figure 1)]. In Group PEPE/TCR/eCG, animals were treated as in protocol PEPE/TCR plus eCG on D8 (Figure 1).

During the experiments the intravaginal devices utilized were either new (n = 157) or had been used only one time (n = 286).

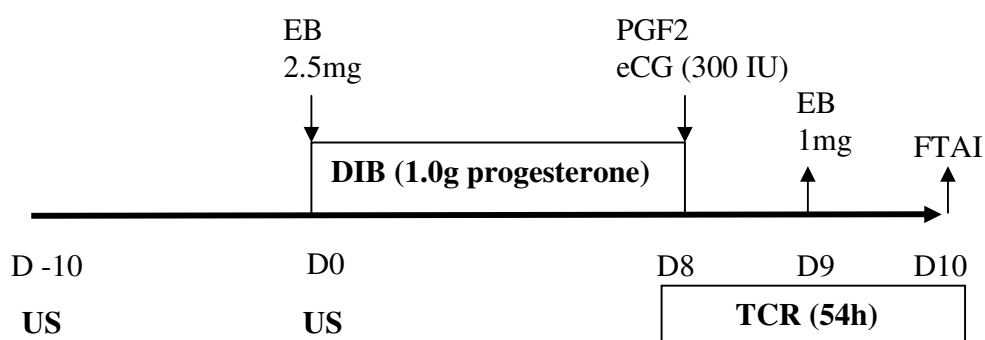


Figure 1. Protocol PEPE/TCR/eCG. **US:** ultrasonography; **PGF2:** prostaglandin F2 α ; **TCR:** temporary calf removal; **FTAI:** fixed-time artificial insemination; **EB:** estradiol benzoate.

2.4. Ultrasonography and Radioimmunoassay

Ovarian ultrasonography (US) was performed (Aloka SSD 500, transrectal probe of 7.5MHz), ten days before (D-10), and at the beginning of hormonal treatment (D0), in

order to detect the presence of corpus luteum [CL (Figure 1)].

Blood samples were randomly collected (BS) from 22.7% (78/343) of the animals that did not present corpus luteum in the two ultrasonographic exams (D-10 and D0), to confirm their postpartum anestrus status, by mean plasma progesterone concentration. The samples (10mL) were obtained from the jugular vein (Vacutainer[®]), and immediately placed on ice. Plasma was separated by centrifugation within 4 h (900 x g for 15 min) and then stored at – 20 °C until P4 radioimmunoassay. The assay was performed according to the method described by Knickerbocker et al. [25], and the same source of antiserum was utilized. Antiserum to bovine P4 was a gift from Dr. Magaly Manzo (Faculdade de Ciências Veterinárias, Macaray, Venezuela). The intra- and inter- assay coefficients of variation were 4.82 and 10.61%, respectively, and the sensitivity of the assay (concentration at 90% zero binding) was 50.2 ± 0.7 pg/100 μ L.

2.5. Statistical Analysis

The pregnancy data obtained for the four experimental groups were analyzed by logistic regression considering the following factors in the model: bull (farm + inseminator + bull), number of births, presence of CL, days postpartum, number of DIB uses, temporary calf removal (yes or no), eCG (yes or no) and interactions between calf removal and eCG, removal and cyclicity, eCG and cyclicity. These analyses were performed using PROC GENMOD from the program Statistical Analysis System [26].

3. Results

The pregnancy rates are summarized in Table 1. There was no significant difference in the pregnancy rate of animals treated with the 4 hormonal protocols treatment comparisons were adjusted for differences among the bulls. Furthermore, the animals treated with DIB® new or used presented similar pregnancy rate [81/157 (51.6%) and 129/286 (45.1%) respectively, $p>0.05$]. However, it was verified an increase in pregnancy rate of multiparous (186/360, 51.7%) when compared to primiparous cows (24/83, 28.9%, $p<0.01$; Figure 2).

Table 1. Pregnancy frequency (% , between brackets) in Nelore cows, 40 to 80 days postpartum, treated with protocols PEPE, PEPE/eCG, PEPE/TCR and PEPE/eCG/TCR, in the presence (+) or absence (-) of a corpus luteum (CL) at the beginning of the treatments.

CL	PEPE	PEPE/eCG	PEPE/TCR	PEPE/eCG /TCR
+	16/29 (55.2)	07/15 (46.7)	15/33 (45.5)	10/23 (43.5)
-	38/79 (48.1)	56/101 (55.4)	29/73 (39.7)	39/90 (43.3)
Total	54/108 (50.0)	63/116 (54.3)	44/106 (41.5)	49/113 (43.4)

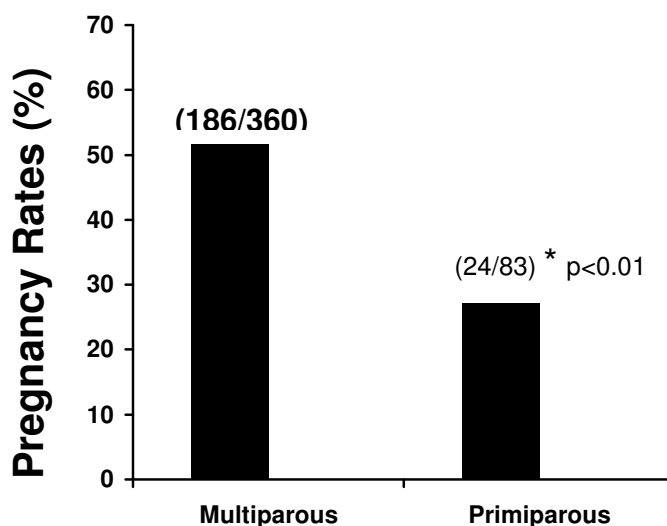


Figure 2. Pregnancy rates in lactating multiparous or primiparous Nelore cows, submitted to fixed-timed AI protocols (PEPE, PEPE/eCG, PEPE/TCR and PEPE/eCG/TCR).

When the animals from the different protocols (PEPE, PEPE/eCG, PEPE/TCR and PEPE/eCG/TCR) were divided according to postpartum days (less than 45 days, from 45 to 70 days and more than 70 days postpartum) independent of the protocol utilized, the pregnancy rates were, respectively, 49.3% (34/69), 46.6% (75/161) and 47.2% (94/199, $p > 0.05$). By separating the animals according to body condition (< 2.5 ; $\geq 2.5 \leq 3.25$ and > 3.25) the following pregnancy rates were obtained: 25.7% (9/35), 50.0% (167/334) and 45.9% (34/74), respectively ($p > 0.05$).

Of the 78 animals whose blood samples were utilized for determination of plasmatic concentrations of progesterone, 17% presented levels above 1ng/mL, indicating the

presence of functional CL, despite the fact that these CL had not been detected by ultrasonographic exams realized on days D-10 and D0.

The pregnancy rates of animals that were treated with protocols that contained eCG (PEPE/eCG and PEPE/eCG/TCR) and those that did not receive eCG (PEPE and PEPE/TCR), did not differ significantly [112/229 (48.9%) vs. 98/214 (45.8%) respectively, $p>0.05$]. The same occurred with the protocols in which TCR was utilized or not, [37.9% (83/219) and 52.2% (117/224), respectively; $p>0.05$]. The pregnancy rates were similar in animals with CL (cycling) or without CL (anestrus) at the beginning of the hormonal treatments [respectively, 48.0% (48/100) vs. 47.2% (162/343), $p>0.05$]. No interactions were observed between: TCR and application of eCG ($p>0.05$); eCG and cyclicity ($p>0.05$); TCR and cyclicity ($p>0.05$) and TCR, use of eCG and cyclicity ($p>0.05$).

4. Discussion

There was no significant difference in the pregnancy rate of animals submitted to hormonal protocols with progesterone (PEPE, PEPE/eCG, PEPE/RTB and PEPE/eCG/RTB). Although the majority of cows were in anestrus at the beginning of treatments the average pregnancy rate in the four groups was acceptable (47.4%, 210/443).

The concentrations of progesterone released by intravaginal devices are lower than those found in the luteal phase, which allows increase in LH pulsatility, inducing greater growth of the dominant follicle and, consequently, increased production of estradiol, resulting in

ovulation in 75 to 100% of the cows, after removal of the device [27,28,19]. Another beneficial effect from progesterone in cows in postpartum anestrous is the prolonged life of the corpus luteum formed from the follicle selected in this period, probably by inhibiting oxytocin receptors in the endometrium, decreasing the probability of occurrence of short cycles [29].

The protocol PEPE has undergone modifications in the attempt to further improve follicular growth and synchronization of ovulation. There are indications in the literature that the association of eCG with the PEPE protocol can increase the pregnancy rate in zebu [11,30] or cross-breed cattle (indicus vs. taurus, [29]), especially if the animals are in postpartum anestrous and with low body condition score (≤ 2 , on a scale from 0 to 5; [30,31]). However, Cutaia et al. [32] did not observe a significant increase in pregnancy rate of postpartum cows treated with PEPE protocol associated with eCG (400 IU) when compared to cows that did not receive eCG. It must be emphasized that the majority of animals were cycling (presence of corpus luteum) at the beginning of the treatments performed by Cutaia et al. [12].

According to Yavas & Walton [33] the use of eCG associated with devices that release progestins induces ovulation, diminishes postpartum interval and increases the pregnancy rate.

Baruselli et al. [31] in comparing the diameter of the dominant follicle, the ovulation rate and plasma concentration of progesterone in lactating precipitous crossbred cows treated with the PEPE vs. PEPE protocol plus eCG (400 IU), observed that the use of eCG induced significant increase in follicular diameter, ovulation rate and plasma concentration of

progesterone (12 days after FTAI). This increase in progesterone concentration in animals treated with PEPE/eCG has been reported in other experiments [30]. Higher P4 concentration has been associated with embryo development and the capacity of the concepts to secrete interferon-tau [34] and therefore enhancing the conception rates [35].

Penteado et al. [36] utilized progestins-based protocols (norgestomet) and compared the efficiency of the use of eCG (400 IU) and/or TCR in pregnancy rate. They observed that both eCG and TCR improved the pregnancy rate, compared to the control group (52.7; 47.4 and 37.3%, respectively). However, the results obtained with the control group (similar to PEPE protocol), in this study, were lower than those usually obtained with protocol PEPE [37,17], which may explain the positive results from TCR and eCG observed in this experiment.

In the present experiment there was no significant difference between pregnancy rate of animals that were treated with protocols that contained eCG (PEPE/eCG and PEPE/eCG/TCR = 48.9%) and those that did not receive eCG (PEPE and PEPE/TCR = 45.8%). It must be emphasized that the dose of eCG (300 IU) utilized in this experiment was less than that reported in other studies (400 IU, [32,11,30]). Additionally, the most of the animals [92.1% (408/443)] in this experiment presented good body conditions (score \geq 2.5) at the beginning of treatments. There are indications in the literature that the beneficial effect of adding eCG to the PEPE protocol is evident only in animals with a body score less than 2.5 (scale from 0 to 5, [31]).

In the present study there was no significant difference between the protocols that used TCR (PEPE/TCR and PEPE/eCG/TCR = 37.9%) or not (PEPE and PEPE/eCG = 52.2%).

According to Pires et al. [38] the reproductive responses obtained with TCR can vary according to the age of the cow and the calf, nutritional level or even the genotype of the herd.

It has been demonstrated that TCR (48 h) of cows in anestrus, increases pulsatility of LH [39,40]. Furthermore, Meneghetti et al. [21] verified that removal of calves for 48 h, increased the size of the dominant follicle and the ovulation rate induced by exogenous GnRH, when compared to cows whose calves had not been removed (85.4 vs. 51.0%, respectively).

Barreiros et al. [20] tested, in an experiment performed in two farms, whether TCR would improve pregnancy rate in a PEPE protocol. On the first farm, TCR (Protocol PEPE/TCR) did not improve pregnancy rates in comparison to Group PEPE (45/84; 53.6% vs. 44/87; 50.6%), but on the second farm TCR significantly augmented the pregnancy rate (48/71; 67.6% vs. 35/77; 45.6%, $p < 0.05$). On the other hand, Vasconcelos et al. [22] utilized TCR in lactating Nelore cows before the insertion of an intravaginal device containing progesterone and administration of GnRH (D0) and again utilized TCR after removal of the intravaginal device (D7) until the moment of FTAI and a second dose of GnRH (D9). They observed interaction ($p < 0.05$) between cyclicity and TCR; in cycling cows the TCR diminished the conception rate (29.9% vs. 61.0%). However, in animals in postpartum anestrus, TCR improved the conception rate (53.8% vs. 35.3%).

The fact that animals with corpus luteum (cycling) or only follicles (anestrus), at initiation of protocols, presented similar pregnancy rates (48.0 vs. 47.2%, respectively), indicates that these hormonal treatments were as effective in cycling animals as in

postpartum anestrous, corroborating results reported previously [11,30,41]. However, the number of births (primiparous vs. multiparous) significantly influenced the pregnancy rate (28.9 vs. 51.6%, respectively), as reported by others [42,19].

The pregnancy rates were similar in animals that received new or once-reused intravaginal devices (51.6 vs. 45.1%, respectively). These results are in agreement with those obtained by others [43] and indicate that the reuse of devices may be economically advantageous since they do not significantly diminish the pregnancy rate.

In the present study the postpartum period (less than 45 days, from 45 to 70 days and more than 70 days postpartum) did not significantly influence the pregnancy rate. These results agree with those reported by others [44] and indicate that the hormonal treatments for FTAI can be initiated starting from 40 days postpartum, in cows with good body condition.

It is concluded that during postpartum anestrous (early postpartum), temporary calf removal and/or application of eCG did not improve the efficiency (pregnancy rate) of the PEPE protocol, in Nelore cows with good body condition score.

Acknowledgements

The authors wish to thank Benedicto Raymundo Ferreira and Rosário Pegorer, to allow us to conduct this experiment on their farms (Lageado do Varjão and Estância Rosalito, respectively) and Dra. Magaly Manzo (Macaray, Venezuela) for providing progesterone antiserum. Research was supported by a grant from FAPESP of Brazil (02/08363-0).

Vinícius G. Pinheiro and Alfredo F. Souza received a fellowship from CNPq (Brazil).

References

- [1] 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.
- [2] Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 1988;29:95-109.
- [3] Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in uterus in cattle. *Theriogenology* 1988;29:21-37.
- [4] Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominate follicles during the estrus cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1988; 83:663-71.
- [5] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (Bos indicus). *Theriogenology* 1997;47:1489-505.
- [6] Bo GA, Adams, GP, Caccia, M, Martinez M, Piersom RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 1995;39:193-204.

- [7] Cavalieri J, Rubio L, Kinder JE, Entwistle KW, Fitzpatrick LA. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in Bos indicus cows. *Theriogenology* 1997;47:801-814.
- [8] Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Piersom RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci* 1995;39:193-204.
- [9] Macmillan KL, Burke CR. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 1996;42:307-320.
- [10] Bo GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:307-326.
- [11] Baruselli PS, Marques MO, Nasser LF, Reis EL, Bo GA. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology* 2003;59:214 (abstract).
- [12] Cutaia L, Tríbulo R, Moreno D, Bo GA. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 2003;59:216 (abstract).
- [13] Marques MO, Reis EL, Campos Filho EP, Baruselli PS. Effects of eCG and estradiol benzoate for synchronization of ovulation in zebu cows in postpartum period. In: *Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina* 2003;5:392 (abstract).
- [14] Sá Filho MF, Reis EL, Viel JR JO, Nichi M, Madureira EH, Baruselli PS. Dynamic follicles in anestrus Nelore cows lactating treated with progestins, eCG and eCG e

- GnRH lactate Dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. *Act Sci Veter* 2004;32:235.
- [15] Roche JF, Crowe MA, Boland MP. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. *Anim Reprod Sci* 1992;28:371-8.
- [16] Rossa LAF. Synchronization of the ovulation with eCG or estradiol benzoate in beef cows treated with Crestar in anestrous postpartum. Dissertation (mestrado) Faculty of Veterinary and Zootecnia, São Paulo University 2002;80 p.
- [17] Kastelic JP, Olson WO, Martinez MA, Cook RB, Mapletoft RJ. Synchronization of estrous in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. *J Canadian Vet* 1999;40:173-8.
- [18] McNeilly AS. Suckling and the control of gonadotropin secretion. In: Knobil E, Neill J (eds), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988;2323-2349.
- [19] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000;54:1-23.
- [20] Barreiros TRR, Seneda MM, Balarin OF, Reis EL, Barusseli PS, Pegorer MF, Ereno RL, Barros CM. Effect of temporary calf removal on synchronization of ovulation for fixed timed artificial insemination. *Act Sci Veter* 2003;31:238-239.
- [21] Meneghetti M, Vilela ER, Vasconcelos JLM, et al. Effect of calf removal in the dominant follicles and ovulation rates by the first GnRH in protocols to

- synchronization in anestrus Nelore cows. *Rev Bras Reprod Anim* 2001; 25:286-288.
- [22] Vasconcelos JLM, Perez GC, Santos RM, Sa Filho OG. Effects of progesterone intravaginal device and calf removal on conception in suckled Nelore cows. In: 15th International Congress on Animal Reproduction 2004; 15:120 (abstract).
- [23] Lowmum BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle: the east of Scotland. Edinburgh: College of Agriculture, 1976. p. 1-31 (Bulletin 6)
- [24] Blom E. The structure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. VII Simp. Int. di Zoot, Milão, 1972; 125-139.
- [25] Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Bazer FW, Drost M, Barron DH, Ficher KB, Roberts RM. Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function in cows. *J Anim Sci* 1986;77:381-91.
- [26] SAS. Statistical Analysis System. SAS/STAT Users Guide, Release 6.12 Edition 1999. Cary, NC. SAS Inst., Inc.
- [27] Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De La Sota RL, Wolfenson D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil* 1993; 97:197-203.
- [28] Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50: 225-232.

- [29] Zollers W G Jr, Garverick H A, Smith M F, Moffatt RJ, Salfen BE, Youngquist RS. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected have a short or normal oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 1993;97:329-337.
- [30] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;83:479-486.
- [31] Baruselli PS, Bo GA, Reis EL, Marques MO, Sá Filho MF. Introduction de la IATF em el manejo reproductivo de rebaños de ganado de engorde em Brasil. *Congreso Internacional de Reproducción Bovina* 2005:125-127.
- [32] Cutaia, L, Tríbulo R, Moreno D, Bo GA. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 2003;59:216 (abstract).
- [33] Yavas Y, Walton JS. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000;54:25-55.
- [34] Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1999;54:317-328.

- [35] Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto WP, Grandinetti RR, Bo GA. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology* 2001;55:355 (abstract).
- [36] Penteado L, Ayres H, Reis EL, Madureira EH, Baruselli PS. Effect of administration of eCG and of the temporary calf removal on pregnancy rates of Nelore lactate cows fixed timed artificial insemination. *Acta Sci Vet* 2004;32:223. (abstract)
- [37] Pinheiro VG, Souza AF, Pegorer MF, Ereno RL, Barros CM. Do temporary calf removal (TCR) and/or eCG administration increase pregnancy rates in lactating nelore cows treated with progesterone release intravaginal device? *Reproduction, Fertility and Development* 2006;18:117 (abstract).
- [38] Pires VA, Araújo CR, Mendes QC. Factors that influence in reproductive efficiency in beef breeds. In: *Anais do Simpósio Pecuária Intensiva nos Trópicos, Piracicaba* 2004;355-398.
- [39] Edwards S. The effect of short term calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. *Theriogenology* 1985;23:777-85.
- [40] Williams GL, Griffith MK. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. *J Reprod Fertil* 1995;49:463-475.
- [41] Souza AF, Pinheiro VG, Ereno RL, Barros CM. Pregnancy rates, in Nelore cows, after temporary remove calf and utilization of hormonal protocols with eCG. *Acta Sci Vet* 2004;32:242.

- [42] Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE, Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci* 1990;68:799-806.
- [43] Bó GA, Balla E, Venturini M, TribuloR. Effect of utilization in the CIDR-B devices new or third use in the pregnancy rates in cross-zebu cows submitted fixe time artificial insemination. *Act Sci Vet* 2004;32:225.
- [44] Barreiros TRR, Balarin OF, Baruselli OS, Seneda MM. Effect in postpartum period at the pregnancy rates in Nelore cows submitted to fixe time artificial insemination with use CIDR. *Act Sci Vet* 2005;33:281.