

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ISAC JUNIOR ROMAN**

**RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE PRENHEZ EM VACAS *Bos taurus***  
**DE CORTE LACTANTES SUBMETIDAS À ASSOCIAÇÕES DE**  
**DIFERENTES DOSES DE eCG E PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO À P4**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguiana**  
**2018**

**ISAC JUNIOR ROMAN**

**RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE PREENHEZ EM VACAS *Bos taurus*  
DE CORTE LACTANTES SUBMETIDAS À ASSOCIAÇÕES DE  
DIFERENTES DOSES DE eCG E PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO À P4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiiana  
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R758r Roman, Isac Junior

RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE PREENHEZ EM VACAS *Bos taurus*  
DE CORTE LACTANTES SUBMETIDAS À ASSOCIAÇÕES DE  
DIFERENTES DOSES DE eCG E PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO À P4/  
Isac Junior Roman.

52 p.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do  
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2018.

"Orientação: Fabio Gallas Leivas".

1.Reprodução Animal. 2. Biotécnicas da Reprodução. I.  
Título.

**ISAC JUNIOR ROMAN**

**RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE PREENHEZ EM VACAS *Bos taurus*  
DE CORTE LACTANTES SUBMETIDAS À ASSOCIAÇÕES DE  
DIFERENTES DOSES DE eCG E PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO À P4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução e Produção Animal

Dissertação defendida e aprovada em 23 de maio de 2018.

---

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas  
Orientador - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Gilson Antônio Pessoa  
UFSM

---

Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa  
UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas bênçãos dadas todos os dias, que me permitiram chegar até o presente momento.

Agradeço a meus pais pelas forças, orações e auxílio nas horas que precisei, sempre estavam dispostos a me ajudar.

Aos mestres Luis F. S. Costa, José F. M. Bragança, Ricardo X. Rocha, Mário C. S. Brum, que me ensinaram a base de quem sou hoje.

A minha companheira Ingryd Merchioratto pelo apoio, amizade, companheirismo e auxílio sempre que precisei.

A toda equipe Biotech pelos incontáveis dias de lida, mensurações, diagnósticos de gestação, em especial: Giovane W. Carloto, Cecilia M. Pavin, Bibiana N. Ribas, Hirya F. Pinto, Inaya Campos, Vanessa Buss.

Agradeço à Profa. Daniela dos S. Brum pelos ensinamentos e experiência transmitidos.

Agradeço a Unipampa pela formação acadêmica bem como a oportunidade de executar e apresentar este trabalho.

Ao meu orientador, Fabio G. Leivas, eu digo muito obrigado, obrigado pela paciência, pela parceria do início ao fim deste trabalho, mas acima de tudo obrigado por todos os ensinamentos e oportunidades que o senhor me proporcionou.

Agradeço a equipe da UFSM e da UFPel, as fazendas (Estância Nova Aurora, Estância Retiro, Estância Santa Carmen, Fazenda Posto Branco, Fazenda Nova Querência e Fazenda Invernada Retiro) e aos animais por fazerem parte do trabalho dando oportunidade da existência deste estudo.

E agradeço em especial a Zoetis pela parceria e apoio financeiro à pesquisa.

“A melhor maneira de prever o futuro é inventá-lo.”

Abraham Lincoln

## RESUMO

A alta taxa de animais em anestro compromete a capacidade reprodutiva dos animais. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) permite que animais acíclicos sejam expostos a IA resultando no aumento da taxa de serviço e prenhez. Apesar de os protocolos de sincronização da ovulação já serem considerados estabelecidos, ajustes ainda podem ser realizados para, grupos genéticos específicos, assim como para otimizar os resultados, minimizar os custos e permitir flexibilidade nos manejos. Neste sentido, avaliou-se o efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI de eCG) em protocolos de IATF com 8 ou 9 dias de permanência do dispositivo de progesterona (P4) sobre a taxa de ocorrência de estro, taxa de prenhez e crescimento folicular em vacas de corte *Bos taurus* lactantes. Foram utilizadas 1171 vacas com escore de condição corporal de  $2,80 \pm 0,04$  (Escala de 1 a 5; 1-magra a 5-obesa), oriundas de seis fazendas comerciais localizadas em três regiões distintas do estado do RS e mantidas à pasto. Ao início do protocolo as vacas foram distribuídas em dois tratamentos, homogeneamente quanto a taxa de ciclicidade e escore de condição corporal (ECC): D9 (D0, n=591) ou D8 (D1, n=580), conforme a permanência do dispositivo de progesterona (9 ou 8 dias respectivamente: P4, CIDR®, Zoetis) associado à 2mg de benzoato de estradiol (IM; Gonadiol®, Zoetis). No dia 9, o CIDR foi removido e administrado 12,5 mg de dinoprost trometamina IM (Lutalyse®, Zoetis) e 1mg de cipionato de estradiol IM (E.C.P.®, Zoetis). Neste momento, as vacas foram novamente distribuídas em dois tratamentos: 300 UI (n=605) ou 400 UI (n=566) de eCG (Novormon®, Zoetis), formando 4 tratamentos D8300UI (n=303), D8400UI (n=277), D9300UI (n=302) e D9400UI (n=289). A IATF foi realizada 48 horas após a remoção da P4 utilizando sêmen congelado de 24 touros. Duas doses de sêmen de cada partida foram avaliadas e somente partidas com motilidade progressiva mínima de 30% após descongelação foram usadas (CBRA, 2013). As fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão de cera (Raidl-Maxi, RaidexGmbH, Dettingen/Erms, Germany) no momento da retirada do dispositivo de P4, sendo as fêmeas que não apresentavam tinta no momento da IATF consideradas em cio. A análise estatística foi realizada pelo PROC GLIMMIX do SAS®. O tempo de permanência afetou a taxa de ocorrência de estro, diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo de P4, diâmetro do FD no momento da IATF, [(P= 0,02); (P < 0,0001); (P < 0,0001)], respectivamente, sendo inferior nos grupos com permanência de 8 dias quando comparado à permanência de nove dias. A taxa de prenhez e a taxa de crescimento folicular não foram afetadas pela permanência

(P= 0,62 e P= 0,96), respectivamente. A ocorrência de estro e prenhez da IATF (P/IA) dos grupos D8300UI, D8400UI, D9300UI e D9400UI foram respectivamente (60,4%/40,3%; 66,8%/45,8%; 70,8%/45,0%; 68,8%/ 42,2%; P= 0,01/0,01, P= 0,0001/0,33, P= <0,0001/0,26, P= <0,0001/0,08), sendo a taxa de estro inferior no grupo D8300UI. A taxa de ocorrência de estro, P/IA, diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo de P4, diâmetro do FD no momento da IATF e a taxa de crescimento do FD, não foram afetadas pela dose de eCG [(P= 0,77); (P= 0,50); (P= 0,65); (P= 0,44); (P= 0,17)]. Para estas mesmas variáveis não foi verificado interação entre tempo de permanência e dose de eCG [(P= 0,06); (P= 0,10); (P= 0,73); (P= 0,22); (P= 0,24)]. Adicionalmente o ECC afetou o diâmetro do FD D9 (P<0,0001); FD D11 (P<0,0001); taxa de crescimento do FD (P=0,03); taxa de ocorrência de estro (P<0,0001) e taxa de prenhez (P=0,004), sendo que animais com ECC  $\leq 2,75$  apresentaram resultados inferiores. No estudo foi demonstrado que a permanência do dispositivo de P4 afeta a taxa de cio, diâmetro do FD no momento da retirada da P4, diâmetro folicular no momento da IATF, sendo inferior no grupo permanência D8, no entanto, a taxa de prenhez não é afetada nos grupos tratamento. Quanto a ocorrência de estro o grupo D8300IU foi inferior comparado aos demais, em soma, resultados inferiores foram observados em animais que apresentavam ECC  $\leq 2,75$ . Sendo assim, em protocolos de IATF com duração de 8 dias de exposição a P4, a utilização de 300UI de eCG deve ser preconizada em animais com ECC superior a 2,75.

**Palavras-chaves:** Permanência P4. Ocorrência de estro. IATF.



## ABSTRACT

The high rate of animals in anestrus compromises the reproductive capacity of animals. TAI allows acyclic animals to be exposed to AI resulting in increased service and pregnancy rate. Although ovulation synchronization protocols are already considered to be established, adjustments can still be made to specific genetic groups, as well as to optimize results, minimize costs and allow flexibility in management. In this sense, the effect of different doses of equine chorionic gonadotropin (300 or 400 IU of eCG) on TAI protocols with 8 or 9 days of progesterone device (P4) stay length on the rate of estrus occurrence, rate of pregnancy and follicular growth in *Bos taurus* lactating dairy cows. There were 1171 cows with a body condition score (BCS) of  $2.80 \pm 0.04$  (1 to 5, 1-lean to 5-obese), from six commercial farms located in three distinct regions of the state of Rio Grande do Sul/Brazil and maintained at pasture. At the beginning of the protocol the cows were divided into two treatments, homogeneously on the BCS: D9 (D0, n=591) or D8 (D1, n=580), with 24 hours of difference between groups, according to the stay length of the progesterone device (9 or 8 days respectively: P4, CIDR<sup>®</sup>, Zoetis) associated with 2mg of estradiol benzoate (IM; Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis). On day 9, CIDR was removed and given 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) and 1 mg of estradiol IM cypionate (E.C.P<sup>®</sup>, Zoetis). At this time, the cows were again distributed in two treatments: 300 IU (n=605) or 400 IU (n=566) of eCG (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis), forming 4 treatments D8300IU (n=303), D8400IU (n=277), D9300IU (n=302) and D9400IU (n=289). TAI was performed 48 hours after P4 removal using frozen semen from 24 bulls. Two doses of semen from each batch were evaluated and only departures with minimal progressive motility of 30% after thawing were used. The females had the base of the tail painted with a marking pen (Raidl-Maxi, RaidexGmbH, Dettingen / Erms, Germany) at the time of removal of the P4 device, and the females did not present ink at the time of the TAI considered in estrus. Statistical analysis was performed by PROC GLIMMIX SAS<sup>®</sup>. The stay length time affected estrus occurrence rate, LF diameter at the time of removal of the P4 device, LF diameter at the time of TAI, (P=0.02); (P<0.0001); (P<0.0001), respectively, being lower in the groups with a stay length of 8 days when compared to the stay length of nine days. The pregnancy rate and the follicular growth rate were not affected by the stay length (P=0.62); (P=0.96), respectively. The pregnancy rate and the follicular growth rate were not affected by the stay length (P=0.62); (P=0.96), respectively. The occurrence of estrus and pregnancy of TAI (P/AI) of groups D8300IU,

D8400IU, D9300IU and D9400IU were respectively (60.4%/40.3%, 66.8% / 45.8%, 70.8%) (P=0.01/0.01, P=0.0001/0.33, P <0.0001 / 0.26, P=0001/0.08), with the lowest estrous rate in the D8300IU group. The occurrence of estrus rate, P/AI, diameter of the LF at the time of removal of the P4 device, diameter of the LF at the time of the TAI and the rate of growth of the LF, was not affected by the dose of eCG [(P=0,77); (P=0.50); (P=0.65); (P=0.44); (P=0.17)]. For these same variables, no interaction between stay length time and eCG dose (P=0.06) was observed; (P=0.10); (P=0.73); (P=0.22); (P=0.24). Additionally the BCS affected the diameter of the LF D9 (P<0.0001); LF D11 (P<0.0001); rate of LF growth (P=0.03); estrus occurrence rate (P<0.0001) and pregnancy rate (P=0.004), with animals with BSC  $\leq$ 2.75 presented lower results. In the study it was demonstrated that the stay length of the P4 device affects the estrus rate; the diameter of the FL at the time of P4 withdrawal, the follicular diameter at the time of the TAI, being lower in the D8 stay length group, however, the pregnancy rate is not affected in the treatment groups. Regarding the occurrence of estrus, the D8300IU group was inferior compared to the others, in sum, lower results were observed in animals presenting with BSC  $\leq$ 2,75. Thus, in TAI protocols lasting 8 days of exposure to P4, the use of 300 IU of eCG should be recommended in animals with BSC greater than 2.75.

**Keywords:** Stay length P4. Occurrence of estrus. TAI.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Experimental design. EB = 2 mg of estradiol benzoate; eCG = equine chorionic gonadotropin; ECP = 1 mg of estradiol cypionate; dinoprost = 12.5 mg of dinoprost tromethamine; TAI = timed artificial insemination performed 48 h after removal of the progesterone (P4) insert; US – ultrasound examinations (pregnancy diagnosis).....	43
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Descriptive analyses according to farm location.....	44
TABELA 2	Effect of stay length device P4 and dose of equine chorionic gonadotropin (eCG) on reproductive responses following to the synchronization of estrus and ovulation in <i>Bos taurus</i> suckled beef cows.....	45
TABELA 3	Effect of stay length device P4 and dose of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated with category BCS, on reproductive responses following to the synchronization of estrus and ovulation in <i>Bos taurus</i> suckled beef cows.....	46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

BCS – Body score condition

BE - Benzoato de estradiol

BEN – Balanço energético negativo

BEP – Balanço energético positivo

CE - Cipionato de estradiol

CL- Corpo lúteo

CRH – Corticotrofina

Dn – Dia n

E2 – Estradiol

EB – Estradiol benzoate

ECC – Condição de escore corporal

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

ECP – Estradiol cypionate

EUA - Estados Unidos da América

FD - Folículo dominante

FSH- Hormônio folículo estimulante

GH – Hormônio do crescimento

GnRH- Gonadotrofina

h – Hora

ha – hectare

IA – Inseminação Artificial

IATF- Inseminação artificial em tempo fixo

IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

IM - Intramuscular

IU- International units

LF –Largest follicle

LH – Hormônio luteinizante

mg- Miligrama

ml- Mililitro

°C – Grau *Celsius*

P/IA – Prenhez à IATF

P4- Progesterona

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$

PRL - Prolactina

TAI – Timed Artificial insemination

UI – Unidades internacionais

US – Ultrasound examination

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	Inseminação Artificial.....	19
2.2	Ciclo Estral.....	20
2.3	Anestro.....	24
2.4	Sincronização da Ovulação.....	25
2.5	Programas de Sincronização da Ovulação para a IATF.....	25
2.6	Gonadotrofinas.....	26
2.7	Fatores que Interferem nos Resultados.....	27
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	30
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
6	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho mundial de bovinos totalizando mais de 220 milhões de cabeças (USDA, 2018), sendo o principal produtor comercial de carne bovina com 9,450 milhões de toneladas produzidas e o segundo maior exportador com 1,760 milhões de toneladas exportadas em 2017 (USDA, 2018). Apesar das dificuldades que o setor produtivo da cadeia da bovinocultura de corte atravessou nos últimos anos, devido à situação econômica do país e mais recentemente no ano de 2017, pelos escândalos que abalaram a cadeia da carne (CARVALHO, 2018), a produção brasileira demonstra crescimento nos últimos anos; (CARVALHO, 2018; USDA, 2018). Em relação aos indicadores produtivos, por exemplo, nos anos 2000 um grupo de 100 vacas ocupavam uma área de 250ha e produziam uma taxa de desmame em torno de 40%, já em 2017, esse mesmo número de vacas passou a ser mantido em uma área inferior a 150ha e produzindo uma taxa de desmame em torno de 65% (CARVALHO, 2018). Dados como este demonstram o grande potencial produtivo do país e ainda a capacidade de aumento de produtividade no Brasil.

O incremento produtivo em propriedades de corte passa por alguns pilares básicos, como: nutrição, sanidade, manejo e reprodução. Embora possam ser abordados isolados, qualquer evento que promova alteração em um dos pontos citados promoverá reflexo em toda a cadeia. Um exemplo disto, foi a forte estiagem enfrentada pela região centro-oeste do país no ano de 2014 que fez com que houvesse uma redução na taxa de prenhez e produção de bezerros mais leves. O reflexo disto foi percebido durante os anos de 2015 e 2016, com redução da oferta de bezerros em 2015 e conseqüentemente redução no número de abates e produção de carne em 2016 (CARVALHO, 2018; ZEN, 2016). Portanto, embora o incremento produtivo dependa de diferentes fatores (reprodução, clima), basicamente a cadeia de produção passa pela necessidade da manutenção da produção de bezerros. Independente de outros aspectos da cadeia, o objetivo a ser almejado é produzir um bezerro/vaca/ano.

Neste sentido, embora 365 dias pareça um longo período, a gestação consome a maior parte do tempo neste modelo, sendo que após o parto a fêmea bovina entra em no período de puerpério (até 45 dias), que somados a gestação de em média 285 dias (com variações de até 305 dias), totalizam 325 dias, portanto, restando aproximadamente 40 dias para que seja possível promover uma nova gestação. Tendo em vista que o ciclo estral de uma fêmea tem média de 21 dias, a fêmea pode ser submetida a dois serviços para que ocorra a concepção. No entanto, grande parte das fêmeas que vão retornar à reprodução encontram-se em anestro,



estado esse que se caracteriza pela ausência de atividade cíclica da fêmea, estando impossibilitada de estabelecer a gestação. O anestro é um estado adquirido multifatorial, mas que na maioria das vezes decorre de fatores como balanço energético negativo, presença do terneiro lactante e da própria lactação. Essas variáveis de forma isolada ou em conjunto são capazes de bloquear o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, através da interrupção via *feed back* negativo sobre a secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) levando ao anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2004; HAFEZ, 2004).

O uso de estratégias farmacológicas de manipulação do ciclo estral para se conseguir que a totalidade dos animais possam ser inseminados no período logo após o parto, vem se estabelecendo como uma das principais formas para otimizar a etapa de reprodução das vacas no pós-parto (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). Para isso se faz uso de biotecnologias da reprodução, principalmente a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). A IATF consiste na utilização combinada de diversos hormônios exógenos, que visam modular o ciclo estral da fêmea estimulando o crescimento folicular e a ovulação. Isso possibilita trabalhar com um determinado grupo de fêmeas de forma padronizada, independente do *status* reprodutivo do indivíduo (PERRY et al., 2014; SÁ FILHO et al., 2010). Com base no ciclo estral da fêmea bovina, a utilização exógena de hormônios para manipulação da onda folicular, propiciou a aplicabilidade da IATF em grupos de vacas com números de animais variados e estado reprodutivo distinto. Neste sentido, diferentes protocolos de utilização de fármacos surgiram nesses anos, além de variadas doses para os mesmos, a fim de obter a melhor resposta sem afetar o resultado final de taxa de prenhez (BARUSELLI et al., 2004; PESSOA et al., 2016)

Os protocolos atuais se baseiam na sincronização da onda folicular com base na associação de progesterona (P4) e estradiol (E2) (BARUSELLI et al., 2004; BO et al., 1995). Após um período que mimetiza o diestro, são utilizados fármacos que promovam o crescimento final do folículo, maturação do oócito e redução dos níveis circulantes de P4 mimetizando o proestro. O crescimento folicular e maturação do oócito devem ser considerados pontos chave do processo, pois devido à alta taxa de anestro em vacas lactantes com cria ao pé, a pulsatilidade de GnRH se encontra comprometida (SÁ FILHO et al., 2009). Visando suprir a necessidade gonadotrófica, os protocolos atuais utilizam a suplementação exógena com eCG, fármaco esse capaz de promover as funções supracitadas, de forma mutua, pois ocupa os receptores de hormônio folículo estimulante (FSH) responsável pelo crescimento e hormônio luteinizante (LH) responsável pela maturação (STEWART; ALLEN, 1981). A utilização da eCG, propicia um incremento nas taxas qualitativas e quantitativas do

protocolo de IATF, pois promove aumento do crescimento folicular, ovulação de oócitos de qualidade superior, corpo lúteo (CL) de maior volume, aumento nas taxas de cio e prenhez, quando comparado a vacas que não são suplementadas.

Estudos recentes demonstram que o tamanho folicular, em protocolo com 9 dias de permanência do dispositivo P4, é uma das variáveis que interferem diretamente na taxa de prenhez. Embora o tamanho folicular seja um ponto dependente de diferentes fatores o período de crescimento folicular com exposição à progesterona é crucial, tendo relação direta com o tamanho do folículo no proestro (PESSOA et al., 2016).

Sabendo que o tamanho folicular é o resultado do crescimento diário do folículo dominante ao longo do período de permanência do dispositivo de P4, uma das variáveis para o diâmetro do folículo dominante é o período de permanência do dispositivo de P4, ou seja, desde sua inserção até o momento de sua retirada. Embora esse período possa variar, os protocolos de IATF são comumente baseados em períodos de permanência de 8 e 9 dias.

Embora existam diferentes estudos demonstrando os resultados com tempo de permanência do dispositivo de P4 e doses de eCG diferentes estes são desenvolvidos em fêmeas *Bos indicus* (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010, 2009), não existindo nenhum trabalho demonstrando o efeito da dose da eCG reduzida (300UI) sobre protocolos com permanência do dispositivo de P4 por 8 ou 9 dias para fêmeas *Bos taurus* lactantes. Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do uso de 300 ou 400 UI de eCG em protocolos de 8 ou 9 dias de exposição a progesterona em vacas taurinas de corte lactantes sobre o desenvolvimento folicular e taxa de estro e prenhez na IATF.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Inseminação artificial

A Inseminação Artificial (IA) consiste na deposição mecânica do sêmen de um reprodutor previamente selecionado, na luz do útero da fêmea a ser acasalada (REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008). A IA é uma das biotécnicas da reprodução mais antigas já descritas na história, e os relatos remetem a sua utilização pelos assírios no ano de 1286 na espécie equina (REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008). O primeiro relato descrito em mamíferos de produto proveniente de IA foi o nascimento de um indivíduo da raça poodle em 1776 (AX, 2004; REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008; VANZIN, 2002). Nos anos posteriores diversos estudos iniciaram para uso em animais de produção (bovinos e equinos). Em 1912 a partir de uma publicação de um biólogo russo descreveu as bases para a utilização da IA com cunho produtivo, mas acima de tudo como ferramenta zootécnica, para a busca do melhoramento genético animal (AX, 2004; REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008; VANZIN, 2002).

Outros marcos históricos correlacionados com a IA datam os eventos de elaboração da vagina artificial para coleta de sêmen para cães em 1914; aperfeiçoamento das técnicas de coleta e processamento de sêmen em 1920; confecção da primeira vagina artificial para a espécie bovina em 1926; criopreservação de sêmen em gás carbônico a  $-79^{\circ}\text{C}$  em 1938; descrição de curva de congelação com a etapa de resfriamento a  $5^{\circ}\text{C}$ , a fim de diminuir danos provenientes do choque térmico em 1940; descrição do diluente para sêmen citrato-gema em 1941; descoberta e utilização de glicerol como crioprotetor em 1949; primeiro produto bovino nascido proveniente de IA utilizando sêmen congelado a  $-79^{\circ}\text{C}$  em 1951; utilização de nitrogênio líquido no processo de congelação e armazenamento de sêmen a partir de 1960 (REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008).

No Brasil o primeiro relato de utilização de IA data do ano de 1931, executada na espécie equina, no estado do Rio Grande do Sul, documentada por Antônio Mies Filho, e executada pelo Capitão Deodato Cintra Moreno (REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008; SEVERO, 2015) Em 1954 acontece a obtenção do primeiro produto proveniente de IA a partir de sêmen congelado. A partir da década de 70 ocorre a formação de

um maior número de pesquisadores nessa área e a evolução da IA no Brasil passa a se tornar mais marcantes (REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, 2008; VANZIN, 2002)

As vantagens da utilização da IA são inúmeras como para os fins de melhoramento genético e controle sanitário de doenças (AX, 2004; VANZIN, 2002). Todavia para que a IA possa ser utilizada dentro da propriedade é necessário que a fêmea, ou grupo de fêmeas, a serem submetidas a IA estejam clinicamente aptas a se reproduzir (MORAES, 2008). A fêmea encontra-se apta a se reproduzir quando apresenta órgãos reprodutivos livres de patologias e cíclicas.

Nos manejos de IA, a fêmea bovina deve ser submetida a IA de 12-18h após ser observada em estro, sendo assim, a ciclicidade e a apresentação de estro passa a ser um ponto chave no processo do emprego da técnica nas propriedades (AX, 2004). Normalmente, os sinais clínicos da demonstração de estro são caracterizados pela inquietude, muco vaginal, diminuição na produção láctea e aceitação de monta (outras fêmeas, rufião ou macho) (MORAES, 2008; VANZIN, 2002; VASCONCELOS; SANTOS, 2000). Contudo, em algumas situações o estro pode não ser evidente ou mal observado pelo empregador da técnica, ocasionando assim um problema no emprego da técnica de IA (VASCONCELOS; SANTOS, 2000)

## 2.2 Ciclo estral

A fêmea forma um estoque de folículos durante a vida fetal em um processo conhecido como foliculogênese. Posteriormente ao nascimento a mobilização desse estoque se dará através de estímulos neuroendócrinos que se iniciam com a puberdade (HAFEZ, 2004; MORAES, 2008).

Entende-se por ciclo estral o intervalo entre um estro e outro, que no caso das fêmeas bovinas corresponde a um período de tempo médio de 21 dias (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006; FORDE et al., 2011; MORAES, 2013; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Esse ciclo é controlado basicamente por um sistema de *feed back* através de estímulos neuroendócrinos. Estes sistemas de *feed back*, juntamente com os estímulos neuroendócrinos, controlam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HAFEZ, 2004; MORAES, 2008).

O hipotálamo constitui uma região do cérebro (Tálamo) capaz de produzir e secretar uma gama de substâncias participantes de diversas funções fisiológicas. Do ponto de vista reprodutivo o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (HAFEZ,

2004; MORAES, 2008). O GnRH é liberado no sistema vascular *hipotálamo-porta-hipofisário* e tem a capacidade de estimular a secreção das gonadotrofinas pela hipófise. A hipófise é uma glândula dividida funcionalmente em duas porções, hipófise anterior (adenohipófise) e hipófise posterior (neurohipófise). A partir do estímulo da adenohipófise, proveniente do GnRH, ocorre a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006; FORDE et al., 2011; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

A secreção de gonadotrofinas (FSH e LH) é importante para que haja o crescimento, maturação e ovulação, com posterior luteinização (formação do corpo lúteo-CL) (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). O FSH é o responsável por promover o crescimento do folículo a partir de quando este passa a ser responsivo às gonadotrofinas. O folículo adquire sensibilidade as gonadotrofinas quando atinge tamanho médio de 4mm (HAFEZ, 2004; MORAES, 2008). Com o crescimento folicular ocorre uma diminuição na dependência de FSH e este folículo passa a ser conhecido como folículo dominante, onde sua resposta é maior ao LH do que ao FSH (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006; FORDE et al., 2011; MORAES, 2008; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Durante o ciclo estral ocorrem eventos fisiológicos, chamados de onda de crescimento folicular. O número de ondas foliculares varia de acordo com a idade e gênero (*B. indicus* x *B. taurus*), embora um número médio de 2-3 ondas foliculares possa ser considerado como padrão (WOLFENSON et al., 2004).

Os eventos que ocorrem durante o período de duração do ciclo estral podem ser divididos em duas fases, definidas através dos dois principais hormônios ovarianos, que conforme as fases do ciclo assumem níveis plasmáticos diferentes (MORAES, 2008). Através desta diferença, os níveis circulantes modulam o mecanismo de *feed back*. As duas divisões do ciclo estral definidas a partir do hormônio circulante mais atuante são: fase lútea e fase folicular (BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996).

A fase lútea perdura desde a formação do corpo lúteo (CL) até a sua lise (luteólise). O CL é uma glândula transitória responsável pela secreção de progesterona (P4). A progesterona é responsável pelo status de *feed back* negativo sobre o hipotálamo, através desse bloqueio sobre o hipotálamo a secreção de GnRH é parcialmente bloqueada. (BARUSELLI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004) Durante a fase lútea ocorrem ondas de crescimento folicular, as ondas de crescimento folicular passam por algumas etapas, sendo elas: recrutamento, seleção, crescimento, divergência/dominância, ovulação (BARUSELLI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004).

O recrutamento é a mobilização das reservas de folículos primordiais presente nos ovários da fêmea. O recrutamento é modulado por fatores intrínsecos e endócrinos, contudo, nessa fase os folículos não possuem sensibilidade às gonadotrofinas, reagindo à fatores como: fator de crescimento semelhante a insulina principalmente do tipo 1 (IGF-I) e hormônio do crescimento (GH) (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). O fim da etapa de recrutamento é marcado pelo aumento do diâmetro folicular, formação do antro folicular e desenvolvimento da sensibilidade às gonadotrofinas (BARUSELLI et al., 2007; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Durante a fase de recrutamento, um grande número de folículos primordiais é estimulado (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). No entanto, durante a fase de seleção somente uma parcela dos folículos desenvolverá a sensibilidade às gonadotrofinas. Esta é adquirida através da síntese e exposição dos receptores para as mesmas. Mesmo que durante a fase lútea o hipotálamo esteja parcialmente bloqueado pela P4, uma pequena quantidade de GnRH é liberada no sistema porta hipotálamo-hipofisário, o que proporciona o estímulo a hipófise a secretar a FSH (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Em resposta ao estímulo de GnRH a hipófise secreta FSH e LH, estas gonadotrofinas possuem características diferentes quanto a sua secreção. O FSH é secretado simultaneamente a sua produção e o LH é armazenado e liberado em pulsos. O FSH promoverá o crescimento do grupo de folículos recrutados. Conforme os folículos crescem acontece uma nova etapa, a divergência folicular ou mais conhecida como dominância folicular (folículo dominante – FD) (BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

A dominância folicular acontece quando, dentro do grupo de folículos selecionados, um folículo é escolhido para terminar a etapa de crescimento e atingir a ovulação (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Os eventos pelos quais a fêmea seleciona o FD ainda não são elucidados. No entanto, o folículo que adquire a dominância é sempre o folículo que desenvolve responsividade maior ao LH do que ao FSH. O FD é capaz de produzir e secretar inibina, hormônio responsável por promover a atresia dos folículos subordinados (folículos subordinados – grupo de folículos recrutados, mas que não se tornaram dominante). Com a atresia dos folículos subordinados o FD passa a receber todos os suprimentos de substratos necessários para seu desenvolvimento (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). Conforme o FD cresce, os níveis de E2 produzidos nas células da granulosa aumentam exponencialmente. O aumento de E2 durante a fase lútea é responsável por aumentar o estímulo sobre o hipotálamo consequentemente aumentando a secreção de gonadotrofinas

(BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). A etapa de ovulação depende, além de um FD, do fim da fase lútea, proeminência da fase folicular/estrogênica, aumento da secreção de E2, aumento da pulsatilidade de LH (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

A luteólise ocorre a partir da secreção de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) produzida pelo endométrio. O aumento na secreção de E2 pelo FD promove além das funções supracitadas, a ativação dos receptores de ocitocina presentes no endométrio. A neurohipófise é responsável pela secreção ocitocina, este hormônio ao se ligar nos receptores presentes no endométrio, promove a secreção de PGF2 $\alpha$ . A PGF2 $\alpha$  dará início à cascata de luteólise, sendo que a partir da luteólise, os níveis plasmáticos de P4 caem, ocorrendo assim o desbloqueio do hipotálamo (BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Ao fim da fase lútea (luteólise), se inicia a fase folicular/estrogênica, marcada pela elevação principalmente de E2. O aumento de E2 também desempenha o papel de sinalização do momento certo para o acasalamento. Este período é determinado pelo estro, dura em torno de 12 horas, onde durante este período a fêmea fica receptiva a monta, ou demonstra o horário correto para emprego da IA (BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

A ovulação ocorre de 12-18hrs após o término do estro (MORAES, 2008). Em um período que naturalmente a fêmeas não está receptiva a monta. Sendo assim o estro é um balizador para o emprego da IA, uma vez que quanto mais próximo da ovulação a IA acontecer, melhores são os resultados (BARUSELLI et al., 2007).

Durante a fase lútea ocorrem várias ondas de crescimento folicular e essas ondas passam pelas fases de recrutamento, seleção, dominância. Somente quando houver uma onda de crescimento ativa e essa se interpor ao fim da fase lútea (em média ao 16<sup>o</sup> dia do ciclo estral) é que o FD poderá completar seu crescimento, culminando com a ovulação do oócito a ser fecundado (BARUSELLI et al., 2007).

Portanto para que ocorra o desenvolvimento folicular adequado seguido de ovulação, os eventos neuroendócrinos devem estar finamente regulados. Qualquer interferência promoverá quadros anovulatórios ou o desenvolvimento de quadros de anestro (ausência de ciclicidade). Nesta situação não acontecerá ovulação e o *status* reprodutivo da fêmea será comprometido (BARUSELLI et al., 2007; GINTHER et al., 1996; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

### 2.3 Anestro

O anestro é o quadro clínico reprodutivo da fêmea caracterizado pela ausência de atividade cíclica (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Durante o período em que a fêmea não possui atividade cíclica, ela se torna incapaz de manifestar estro, impossibilitando assim a capacidade de se reproduzir naturalmente ou a possibilidade de emprego de técnicas de reprodução, por exemplo, a IA (BARUSELLI et al., 2007; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Embora a ausência de atividade cíclica possa ser considerada uma desordem reprodutiva, o anestro pode ser considerado fisiológico ou patológico, essa divisão pode ser feita a partir da condição que esteja promovendo o quadro clínico. O anestro pós-parto, até 30-40 dias pós-parto, é considerado fisiológico (HAFEZ, 2004; MORAES, 2008). Nesse período acontece à involução uterina, reorganização hormonal, desenvolvimento de ondas foliculares mais curtas e recuperação do endométrio. Embora uma única desordem seja capaz de promover o quadro de anestro, normalmente o quadro se constitui de eventos multifatoriais. A lactação e a incompleta involução uterina, juntamente com os problemas nutricionais são os principais fatores que interferem na atividade cíclica (BARUSELLI et al., 2007; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Durante a lactação a fêmea secreta prolactina (PRL), hormônio que promove a lactogênese (GINTHER et al., 2012). A PRL é uma das substâncias capazes de fazer *feed back* negativo sobre o hipotálamo na liberação de GnRH, isso causa o quadro conhecido como anestro lactacional, mais proeminente em *Bos indicus* (BARUSELLI et al., 2007; SARTORI; BARROS, 2011; SHORT et al., 1990). Além da função reprodutiva sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, a PRL promove uma maior metabolização hepática de P4. Quanto maior a produção láctea da fêmea, maior é o sequestro de P4 pelo fígado, conseqüentemente ocorrem oscilações nos níveis plasmáticos de P4. As oscilações nos níveis de P4 circulantes promovem um desequilíbrio sobre o mecanismo de bloqueio e liberação exercido pela P4 sobre o hipotálamo (GINTHER et al., 2012).

O ECC é uma ferramenta quantitativa macroscópica, que permite monitorar o *status* nutricional do animal. Serve de indicativo para avaliar indiretamente fatores como balanço energético negativo (BEN), e balanço energético positivo (BEP). Os problemas relacionados com a nutrição são sem dúvida os principais promotores envolvidos no desenvolvimento dos quadros de anestro. As deficiências alimentares juntamente com os estímulos endócrinos para mobilização das reservas corporais, faz com que haja ausência ou diminuição na produção de



liberação de IGF-I, GnRH, FSH, LH, P4. Isso se deve entre outros fatores pela liberação de cortisol pelas adrenais, através do estímulo de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise (BARUSELLI et al., 2004; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

#### **2.4 Sincronização da ovulação**

Para que ocorra a possibilidade da fêmea gestar é necessário que a mesma possua atividade cíclica, manifeste estro e ovule um ócito viável que possa ser fecundado. A ovulação, portanto, passa a ser um ponto chave para o sucesso reprodutivo (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Devido a problemas relacionados com a lactação e nutrição, um grande número de animais se apresenta com atividade cíclica comprometida. Para que se promova uma nova ovulação nessas condições adversas algumas ferramentas podem ser empregadas, dentre elas protocolos de sincronização da ovulação (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

Os programas de sincronização da ovulação se baseiam na utilização exógena de fármacos. Estes produtos visam modular o ciclo estral da fêmea e promover o desenvolvimento de uma onda folicular, mimetizando as etapas fisiológicas que ocorrem durante o ciclo fisiológico (GENTRY; WALKER; GENTRY, 2016; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011). A possibilidade de manipular o ciclo estral da fêmea proporciona a possibilidade do emprego da técnica de IA sem que haja a necessidade de identificação de estro (BARUSELLI et al., 2004; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

#### **2.5 Programas de sincronização da ovulação para IATF**

Existem dois tipos de protocolos de sincronização da ovulação para IATF: os que utilizam a associação de P4+E2 e os que se baseiam em GnRH+PGF2 $\alpha$  (BARUSELLI et al., 2004; BO et al., 1995). Os protocolos promovem uma fase de atresia folicular através da associação de P4+E2 ou GnRH, que visam encerrar uma possível onda de crescimento vigente e promover o início ordenado de uma nova onda folicular (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). Posterior a esta fase inicial do protocolo os eventos de recrutamento, seleção, divergência e crescimento folicular ocorrem de maneira natural, até a fase de luteólise e/ou supressão de P4. Esta etapa pode ser promovida pela utilização de análogos de PGF2 $\alpha$  e/ou remoção de fontes de P4 (dispositivo de P4).

No caso dos protocolos que utilizam a associação P4+E2 o crescimento folicular final pode ser estimulado com auxílio de gonadotrofinas exógenas (FSH, LH, eCG) (BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006). Com a utilização de qualquer das metodologias ocorrerá o estímulo para o crescimento folicular e a ovulação. Em ambas as técnicas ocorre o estímulo para a ovulação com aplicação de GnRH (protocolos denominados de *Ovsynch*® ou de uma fonte exógena de E2 (benzoato de estradiol - BE; cipionato de estradiol - CE) no caso dos protocolos P4+E2 (BARUSELLI et al., 2004).

Os protocolos *Ovsynch* (GnRH+PGF2 $\alpha$ ) são usados massivamente nos países da Europa e EUA (Estados Unidos da América). Isto se deve a proibição do uso de hormônios esteroides (E2) nos animais de produção. A oscilação nos resultados obtidos quando comparado animais cíclicos e em anestro é uma situação que dificulta a utilização do protocolo *Ovsynch*® em larga escala. Esta variação dos resultados está ligada à condição reprodutiva encontrada na maioria dos animais (BARUSELLI et al., 2004; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). No entanto, os protocolos baseados em P4+E2 não demonstram uma diferença tão exacerbada quando se compara os resultados entre animais cíclicos e em anestro. Além disso, devido a utilização de dispositivos de P4, juntamente com a suplementação de gonadotrofinas, propicia um incremento nos resultados obtidos em animais acíclicos (BARUSELLI et al., 2004).

## 2.6 Gonadotrofinas

Algumas medidas podem ser tomadas para sanar os problemas relacionados com os animais em anestro, dentre as quais se pode citar, exposição ao macho, remoção de bezerro, suplementação com P4 e administração de gonadotrofinas (LH, FSH, eCG). Estas estimulam quadros de crescimento folicular, podendo chegar a ovulação do FD. No entanto, embora isoladas estas medidas possam ser eficazes, quando somadas uma ou mais ferramentas, os resultados se tornam mais consistentes (YAVAS; WALTON, 2000).

A associação entre suplementação de P4 via dispositivos intravaginais e gonadotrofinas exógenas, apresenta os melhores resultados quando comparado as demais ferramentas. Essa associação é capaz de promover o desenvolvimento de uma onda folicular, ovulação, formação de CL viável. Este CL irá manter a prenhez ou promoverá a modulação das ondas foliculares e ciclo estrais posteriores (YAVAS; WALTON, 2000).

O FSH e a eCG são as gonadotrofinas exógenas que podem ser utilizadas para auxiliar no crescimento folicular (GENTRY; WALKER; GENTRY, 2016). Embora ambas tenham a

capacidade de estimular o crescimento folicular, e conseqüentemente melhorar as taxas de estro e prenhez, a eCG possui efeito mais destacado frente aos estímulos do FSH (GENTRY; WALKER; GENTRY, 2016; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011).

A eCG por sua característica impar é a única gonadotrofina capaz de se ligar tanto em receptores de FSH quanto de LH (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; STEWART; ALLEN, 1981). Sua síntese acontece nos cálices endometriais de éguas prenhas do 40° ao 120° dia de gestação (STEWART; ALLEN, 1981). A eCG é uma molécula de meia-vida longa (96h) com pico de ação de 36-48h (STEWART; ALLEN, 1981). A utilização ocorre no final de protocolos com o objetivo de promover o crescimento final do folículo dominante, além de auxiliar na maturação do oócito devido sua ligação aos receptores de LH (MENEGHETTI et al., 2009; PESSOA et al., 2016; SÁ FILHO et al., 2010, 2009)

## **2.7 Fatores que interferem nos resultados**

O resultado esperado a partir da utilização de uma ferramenta de manipulação do ciclo estral é a prenhez (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009). No entanto, alguns indicadores observados durante o processo de execução do protocolo podem auxiliar na expectativa final, ou seja, na taxa de prenhez. A taxa de estro e o tamanho do FD no momento da retirada do dispositivo de P4 e IA, denotam dois dos principais indicadores (BILBAO et al., 2015; BRIDGES et al., 2012; POHLER et al., 2012; SÁ FILHO et al., 2010).

A taxa de estro está diretamente correlacionada com a taxa de prenhez e ambas são afetadas pelo diâmetro do folicular no momento da remoção da P4 e da IA (PESSOA et al., 2016). O tamanho do FD é resultante dos estímulos endócrinos e exógenos, que ocorrem durante o período de duração dos protocolos de IATF. A inserção do dispositivo de P4 aumenta os níveis plasmáticos de P4 resultando na modulação da secreção dos hormônios hipotalâmicos. Ao final do período de estimulação de P4 o objetivo é a obtenção de um folículo mais responsivo ao tratamento de gonadotrofina. A resposta à suplementação gonadotrófica está correlacionada com o diâmetro do FD, onde quanto maior o FD no momento da retirada de P4/aplicação de gonadotrofina, melhor serão os resultados posteriores (PESSOA et al., 2016).

O diâmetro do FD varia de acordo com o escore de condição corporal (ECC), ciclicidade, emergência folicular (posterior à sincronização inicial do protocolo de IATF), estímulos endócrinos (secreção de IGF-I, FSH) e ao estímulo modulador efetuado pelo dispositivo de P4. A modulação efetuada pela P4 durante a permanência do dispositivo

garante o *feed back* negativo sobre o hipotálamo, controlando a secreção de FSH e LH, impedindo que haja aumento na pulsatilidade de LH, suprimindo a capacidade ovulatória do FD, resultando no crescimento diário constante enquanto durar o período de permanência de P4 (BARUSELLI et al., 2004; BINELLI; IBIAPINA; BISINOTTO, 2006).

A utilização de eCG permite a estimulação final entre o período da remoção do dispositivo de P4 e a IATF. A utilização da eCG promoverá o crescimento do FD, resultando em melhores taxa de estro e prenhez (BARUSELLI et al., 2004; PESSOA et al., 2016). O efeito da eCG depende de fatores como raça (*Bos indicus* maior sensibilidade), diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo e propriamente dito a dose a ser utilizada (BARUSELLI et al., 2004).

O diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo de P4 pode variar de acordo com ECC, ciclicidade (PESSOA et al., 2016), e também sobre o tempo de exposição a P4 (FERRAZ JUNIOR et al., 2016; SANTOS et al., 2018). O menor diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo de P4 resulta em menor taxa de cio e de prenhez (FERRAZ JUNIOR et al., 2016; PESSOA et al., 2016). O menor diâmetro do FD também diminui a resposta a eCG, resultando em uma diminuição dos efeitos oriundos da utilização da eCG (BARUSELLI et al., 2004; FERRAZ JUNIOR et al., 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da associação de diferentes doses de eCG e períodos de exposição à P4 em vacas de corte (*Bos Taurus*) submetidas a protocolos de sincronização da ovulação e IATF

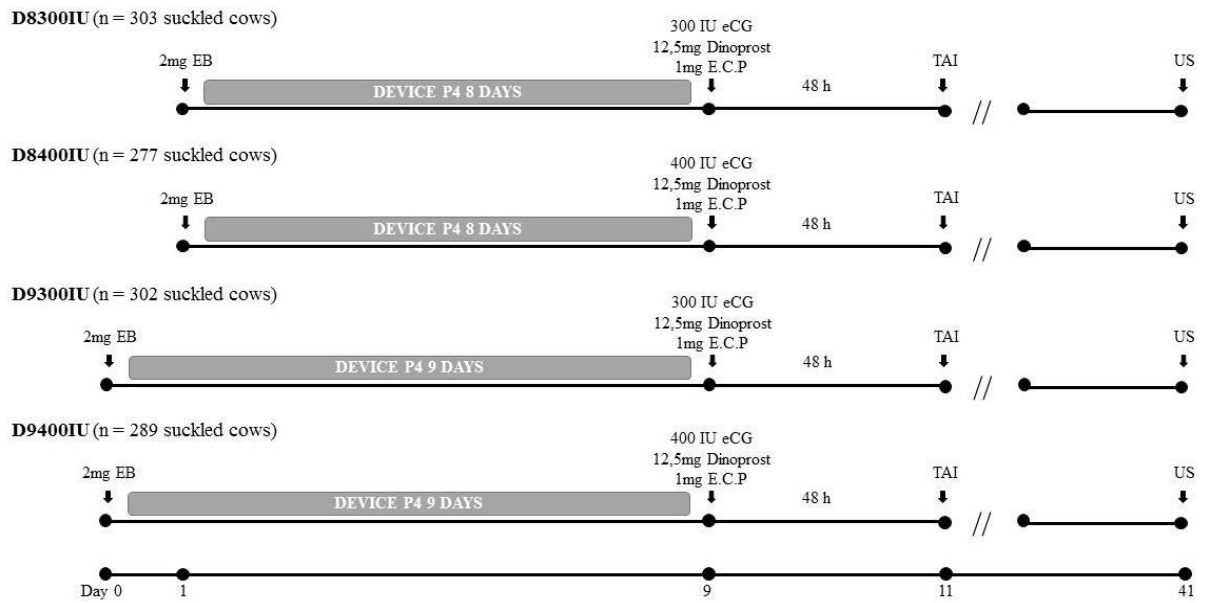
#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da redução para 300UI de eCG em protocolos de 8 dias de exposição à progesterona em vacas *Bos taurus* de corte lactantes sobre:

- O crescimento do folículo de maior diâmetro entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF;
- A taxa de ocorrência de estro no momento da IATF;
- A taxa de prenhez 30 dias após IATF.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão e Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico *Theriogenology*.



**Figure 1** Experimental design. EB = 2 mg of estradiol benzoate; eCG = equine chorionic gonadotropin; ECP = 1 mg of estradiol cypionate; dinoprost = 12.5 mg of dinoprost tromethamine; TAI = timed artificial insemination performed 48 h after removal of the progesterone (P4) insert; US – ultrasound examinations (pregnancy diagnosis).

**Table 1.** Descriptive analyses according to farm location.

Region of state	Farm	No. of heifers	Multiparous, % (n)	Primiparous, % (n) <sup>1</sup>	Mean of BCS (1-5)	Cyclicity, % (n)	Estrus, % (n) <sup>2</sup>	P/AI, % (n) <sup>3</sup>
Southwest	A	56	6,1% (56)	---	2,57±0,009	26,8% (15)	73,2% (41)	39,3% (22)
	B	378	34,9% (321)	22,6% (57)	2,72±0,001	34,7% (131)	57,9% (219)	37,8% (143)
	C	102	10,3% (95)	2,7% (7)	2,63±0,004	30,4% (31)	46,1% (47)	24,5% (25)
Center-west	D	102	3,9% (36)	26,2% (66)	2,64±0,002	62,7% (64)	63,7% (65)	53,9% (55)
	E	340	29,3% (269)	28,2% (71)	2,86±0,001	36,8% (125)	74,4% (253)	54,7% (186)
Southeast	F	193	15,5% (142)	20,3% (51)	2,96±0,001	47,7% (92)	80,8% (156)	39,4% (76)
Overall		1171	78,5% (919)	21,5% (252)	2,80±0,0004	39,1% (458)	66,7% (781)	43,3% (507)

<sup>1</sup>Proportion of cross-breed cows

<sup>2</sup>Occurrence of estrus between P4 insert removal and timed artificial insemination (TAI) <sup>3</sup>Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after TAI.



**Table 2.** Effect of stay length device P4 and dose of equine chorionic gonadotropin (eCG) on reproductive responses following to the synchronization of estrus and ovulation in *Bos taurus* suckled beef cows

	Treatment				P values (contrasts)		
	D8300IU	D8400IU	D9300IU	D9400IU	Stay Length Device	Treatment eCG	Stay Length Device vs Treatment eCG
<i>Estrus and pregnancy responses (all cows)</i>							
No of animals	303	277	302	289			
BCS (1-5 scale)	2.83±0.02	2.81±0.02	2.80±0.02	2.78±0.02	0.21	0.21	0.53
Occurrence of estrus	60.4%	66.8%	70.8%	68.8%	0.002	0.77	0.06
P/AI	40.3%	45.8%	45.0%	42.2%	0.62	0.50	0.10
<i>Ovarian follicle responses subset 657 cows</i>							
No of animals	162	159	174	162			
LF Diameter at P4 removal, mm	9.3±0.2	9.1±0.2	9.9±0.2	9.9±0.2	< 0.0001	0.65	0.73
Growth rate of the LF, mm/day	1.2±0.1	1.4±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	0.96	0.17	0.24
LF Diameter at TAI, mm	11.6±0.2	11.1±0.2	12.5±0.2	12.5±0.2	< 0.0001	0.44	0.22

<sup>1</sup>Cows received a P4 device (24h of interval; D9, D8) and 2 mg of estradiol benzoate IM on the first day of the protocol for synchronization. The insert was removed nine days after and cows received 1 mg of estradiol cypionate, and eCG treatment with 300 IU or 400 IU.

<sup>2</sup>Body condition score evaluated at the onset of the synchronization protocol.

<sup>3</sup>LF = largest follicle diameter.

<sup>4</sup>Occurrence of estrus = percentage of cows that displayed estrus between P4 device removal and the TAI.

<sup>5</sup>P/AI = pregnancy per AI

**Table 3** Effect of stay length device P4 and dose of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated with category BCS, on reproductive responses following to the synchronization of estrus and ovulation in *Bos taurus* suckled beef cows

	D8300IU		D8400IU		D9300IU		D9400IU	
	≤2.75	≥3.00	≤2.75	≥3.00	≤2.75	≥3.00	≤2.75	≥3.00
No of animals <sup>1</sup>	177	126	168	109	183	119	179	110
Occurrence of estrus <sup>2</sup>	54.8 <sup>d*</sup>	68.3 <sup>bcd</sup>	60.1 <sup>cd</sup>	77.1 <sup>bcd</sup>	60.1 <sup>cd</sup>	87.4 <sup>a</sup>	60.9 <sup>cd</sup>	81.8 <sup>ab</sup>
P/AI <sup>3</sup>	36.2	46.0	41.7	52.3	37.2	57.1	35.8	52.7

<sup>1</sup>Cows received a P4 device (24h of interval; D9, D8) and 2 mg of estradiol benzoate IM on the first day of the protocol for synchronization. The insert was removed nine days after and cows received 1 mg of estradiol cypionate, and eCG treatment with 300 IU or 400 IU.

<sup>2</sup> Occurrence of estrus = percentage of cows that displayed estrus between P4 device removal and the TAI.

<sup>3</sup>P/AI = pregnancy per AI.

a; b; c; d = different letters in same row indicate differences (P<0.05)

## 5. CONCLUSÃO

- Em protocolos de sincronização da ovulação com 8 dias de exposição à P4, a taxa de ocorrência de estro é diminuída, assim como o diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo de P4 e na IATF.
- A taxa de crescimento do maior folículo entre a retirada do dispositivo de P4 e IATF, bem como a taxa de prenhez não são afetadas pela redução da dose para 300 UI de eCG.
- Embora a taxa de prenhez não tenha sido afetada, a ocorrência de estro é afetada pela redução no tempo de exposição à P4 e da dose de eCG.
- Protocolos de 8 dias de exposição à progesterona com dose de 300 UI de eCG podem ser utilizados em vacas *Bos taurus* lactantes desde que os animais apresentem  $ECC \geq 3,0$  sem prejuízo a taxa de estro e prenhez.

## 6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, futuros estudos podem ser conduzidos sobre:

- Expandir o número de animais avaliados quanto aos tratamentos 300 e 400UI de eCG vs a suplementação de P4 por 8 dias comparado a tratamento de 300UI de eCG vs suplementação de P4 por 9 dias.
- Avaliar o uso de 300UI de eCG frente a dois períodos de suplementação de P4 (9 ou 10 dias).
- Avaliar a redução da dose de eCG e sua relação com tempo de permanência do dispositivo de P4 em novilhas cíclicas e pré-púberes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AX, R. L. ET AL. Inseminação Artificial. In: MANOLE (Ed.). . **Reprodução Animal**. 7. ed. ed. Barueri- SP: [s.n.]. p. 381–394.
- AYRES, H. et al. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 175–179, 1 ago. 2009.
- BARUSELLI, P. . et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 479–486, jul. 2004.
- BARUSELLI, P. S. et al. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. v. 31, n. 2, p. 205–211, 2007.
- BILBAO, M. G. et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 536–544, 2015.
- BILBAO, M. G. et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 536–544, 15 jul. 2016.
- BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases Fisiológicas, Farmacológicas e Endócrinas dos Tratamentos de Sincronização do Crescimento Folicular e da Ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, 2006.
- BO, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193–204, 1 ago. 1995.
- BRIDGES, G. A. et al. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 1–2, p. 16–26, 1 jul. 2012.
- CARVALHO, T. B. A importância do Brasil na produção mundial de carne bovina - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. **CEPEA**, 2018.
- CBRA. **Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3.ed. ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- FERRAZ JUNIOR, M. V. C. et al. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nelore cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p.

1939–1943, nov. 2016.

FORDE, N. et al. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 163–169, abr. 2011.

GENTRY, G. T.; WALKER, R. S.; GENTRY, L. R. Impacts of incorporation of follicle stimulating hormone into an estrous synchronization protocol for timed artificial insemination of crossbred beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 168, p. 19–25, maio 2016.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–94, dez. 1996.

GINTHER, O. J. et al. Role of LH in the progesterone increase during the bromocriptine-induced prolactin decrease in heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1969–1976, dez. 2012.

HAFEZ, E. S. E. H. B. **Reprodução Animal**. 7. ed. ed. Barueri- SP: [s.n.].

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of dairy science**, v. 66, n. 12, p. 2645–60, 1 dez. 1983.

JINKS, E. M. et al. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1176–1185, 1 mar. 2013.

MARQUEZINI, G. H. L. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin on follicle development and pregnancy rates in suckled beef cows with or without calf removal<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1216–1224, 1 mar. 2013.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, jul. 2009.

MORAES, J. C. F. ET AL. Controle do Estro e da Ovulação em Ruminantes. In: ROCA (Ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 33–56.

MORAES, F. . Diagnóstico e controle da cinomose canina. **PUBVET**, v. 7, 2013.

PERRY, G. A. et al. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 48, p. 15–20, jul. 2014.

PESSOA, G. A. et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 792–799, 2016.

POHLER, K. G. et al. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 649–664, 18 set. 2012.

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J.C.F; NEVES, J. P. Tecnologia do Sêmen e

- Inseminação Artificial em Bovinos. In: ROCA (Ed.). . **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. ed. São Paulo: [s.n.], p. 57–82.
- RODRIGUES, A. D. et al. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-AI protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in Bos indicus-influenced beef cows<sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 1, p. 236–249, 15 fev. 2018.
- SÁ FILHO, M. F. DE et al. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 79, 1 dez. 2017.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455–463, 1 ago. 2011a.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 132–139, dez. 2011b.
- SÁ FILHO, O. G. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–8, 15 jul. 2009.
- SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrous Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1–2, p. 12–18, mar. 2011.
- SANTOS, M. H. et al. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nelore cows. **Theriogenology**, v. 111, p. 56–61, 2018.
- SANTOS, P. H. et al. Lipid profiles of follicular fluid from cows submitted to ovarian superstimulation. **Theriogenology**, v. 94, p. 64–70, 2017.
- SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, 1 abr. 2011.
- SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte**, v. 39, n. 1, p. 17–21, 2015.
- SHORT, R. E. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in

- postpartum beef cattle. **Journal of animal science**, v. 68, n. 3, p. 799–816, mar. 1990.
- SOUSA, L. M. M. DE C. et al. Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0164089, 6 out. 2016.
- STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of reproduction and fertility**, v. 62, n. 2, p. 527–36, jul. 1981.
- ULBRICH, S. E. et al. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA14) Expression During Estrus in the Bovine Endometrial Glandular Epithelium and Lumen1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 4, p. 795–805, 1 out. 2009.
- USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. **Foreign Agriculture Service**, 2018.
- VANZIN, I. M. **Inseminação artificial e manejo reprodutivo do bovinos**. [s.l.: s.n.].
- VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, R. M. DOS. **Fatores que afetam a detecção de estro | José Luiz M. Vasconcelos e Ricarda Maria dos Santos | MilkPoint**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/jose-luiz-moraes-vasconcelos-ricarda-santos/fatores-que-afetam-a-deteccao-de-estro-16534n.aspx>>. Acesso em: 13 maio. 2018.
- WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21–52, 1 jan. 2002.
- WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042–1055, 15 set. 2004.
- YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 1–23, 1 jul. 2000.
- ZEN, S. DE. A pecuária mudou - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. **CEPEA**, 2016.