

## IMPORTÂNCIA DO PROESTRO NA CONCEPÇÃO E RESULTADOS DE IATF

*L. A. Souto e M. L. Day*

### INTRODUÇÃO

Inseminação artificial (IA) é a mais poderosa entre as tecnologias reprodutivas disponíveis para intensificar o melhoramento genético em bovinos de corte e leite. Esta tecnologia foi amplamente implantada no setor de produção de leite e tem contribuído para o aumento na produção de leite por vaca. No setor de corte, a IA é utilizada em menos do que 10% (Estados Unidos) e 5% (Brasil) das vacas (NAHMS, 1997; IBGE, 1996), ainda que os benefícios econômicos do uso da IA esteja bem documentado (Sprott, 2000; Johnson et al., 2003b; Anderson e Deaton, 2003). O uso da IA não foi largamente adotado na pecuária de corte, em parte porque as exigências em termos de tempo e de mão de obra para detectar o estro muitas vezes tornam a IA pouco prática (Britt, 1987). A detecção de estro também é um desafio para a pecuária leiteira, uma vez que a baixa expressão e detecção de estro diminuem a eficácia dos programas de IA (Pursley et al., 1997a). Para contornar a necessidade de detecção de estro, foram desenvolvidos programas de sincronização de ovulação que facilitam a IATF (Pursley et al., 1997a; Geary et al., 1998). Os programas de IATF foram extensamente implantados no setor de produção de leite com taxa de concepção de aproximadamente 35% (Schmitt et al., 1996, Pursley et al., 1997a, 1997b, 1998). Em vacas de corte, foram observadas taxas de concepção de 48 a 68% (Geary et al., 2001; Lamb et al., 2001; Larson et al., 2006; Bridges et al., 2008) usando protocolos de IATF nos Estados Unidos. É possível obter nova melhoria na fertilidade associada com IATF, especialmente porque tem sido demonstrado que a taxa de fertilização após a IA é de aproximadamente 90% (Diskin e Sreenan, 1980). A mortalidade embrionária precoce (< 30 dias de gestação) pode ser responsável pela infertilidade associada a IATF e foi sugerido (Zavy, 1994) que a mortalidade embrionária é a principal fonte de perda econômica em bovinos.

A perda embrionária durante o início da gestação é causada por muitos fatores como defeitos genéticos, doenças reprodutivas e estresse térmico. Contudo, a mortalidade embrionária pode estar exacerbada em certos animais como vacas leiteiras de alta produção em lactação e após a IATF tanto em bovinos de corte como de leite. Uma similaridade encontrada em vacas leiteiras em lactação e em vacas sincronizadas para IATF é que uma proporção destes animais tem menores concentrações circulantes de estradiol pré-ovulatório e progesterona no meio da fase lútea (Vasconcelos et al., 2001; Sartori et al., 2002a; Perry et al., 2003b; Peters e Pursley, 2003; Sartori et al., 2004; Wolfenson et al., 2004). O aumento do metabolismo de esteróides, como resultado do maior consumo de alimento e do fluxo sanguíneo hepático, diminui as concentrações circulantes de estradiol e progesterona em bovinos de leite (Sangsrivong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003). Com a IATF, a diminuição das concentrações de esteróides pode ser atribuída a uma dinâmica folicular aberrante durante os protocolos de sincronização de estro (Geary et al., 2000) e a ovulação induzida de pequenos folículos em alguns animais (Perry et al., 2002, 2003b). Vacas leiteiras em lactação (Lucy, 2001) e bovinos induzidos a ovular folículos menores do que os típicos têm menor fertilidade (Lamb et al., 2001; Perry et al., 2003a). A razão (ou razões) fisiológica para redução da fertilidade de animais com este meio de hormônio esteróide aberrante poderia inclusive comprometer a qualidade do ovócito ou o suporte uterino para o conceito. Ainda que tenha sido sugerido que a qualidade do ovócito está reduzida em vacas leiteiras (Sartori et al., 2002b), Rizos et al. (2005) não observaram diferenças na taxa de clivagem ou produção de blastocistos entre vacas em lactação e novilhas núlparas após a recuperação do óvulo e maturação e fertilização *in vitro*. Sartori et al. (2006,) observaram taxas de prenhez similares no dia 25 a 32 e perda

embrionária tardia entre os dias 25 e 66 em vacas leiteiras lactantes não submetidas a estresse calórico após transferência de embrião ou IA. Estes estudos inferem que, em vacas leiteiras, um ambiente uterino deficiente pode ser responsável por maior mortalidade embrionária. Um ambiente uterino inadequado pode ser responsável também pela mortalidade embrionária em bovinos induzidos a ovular folículos imaturos. Em ovelhas, a exposição sequencial a progesterona antes do estro elevou as concentrações de estradiol ao estro e concentrações suficientes de progesterona no ciclo estral subsequente são necessárias para estabelecer o ambiente uterino adequado para a sobrevivência do conceito (Moore, 1985; Wilmut et al., 1986). Além disso, alterar a exposição sequencial aos esteróides ou limitar as concentrações de estradiol ou progesterona resultam em alteração da função uterina e diminuição da sobrevivência do conceito (Miller e Moore, 1976a; 1976b; 1983). Este processo parece ser interrompido em vacas leiteiras e bovinos induzidos a ovular folículos imaturos, como é indicado pelas concentrações circulantes de estradiol e progesterona. Temos observado que a taxa de prenhez à transferência de embrião é menor em vacas induzidas a ovular folículos ovarianos imaturos do que nas vacas que ovulam folículos maduros (Mussard et al., 2003), sugerindo que o defeito em animais que ovulam folículos imaturos está no útero.

Com base no que é conhecido, os programas de IATF que resultam em ovulação de folículos ovarianos maduros, que produzem concentrações ideais de estradiol durante o período pré-ovulatório, devem resultar em taxas de prenhez mais altas. O presente trabalho irá tratar da maturidade folicular, as concentrações pré-ovulatórias de estradiol e seu efeito sobre a taxa de prenhez com IATF, abordagens práticas para aumentar a influência gonadotrópica sobre a maturidade do folículo, além das abordagens com sincronização de estro que otimizam estes fatores para a IATF.

## MATURIDADE DO FOLÍCULO, PROESTRO E FERTILIDADE

A influência da maturidade do folículo ovulatório sobre a fertilidade tem sido o enfoque do nosso laboratório (resultados resumidos em Mussard et al., 2003; Mussard et al., 2007) e outros (Perry et al., 2002). Inicialmente, levantamos a hipótese de que o diâmetro do folículo ovulatório era o melhor indicador da “maturidade” do folículo e que as vacas induzidas a ovularem folículos pequenos teriam fertilidade menor do que as vacas que ovulam espontaneamente, ou são induzidas a ovularem folículos dominantes de maior tamanho. Dentro de cada série de 3 experimentos (Experimentos 1, 2, 3; Tabela 1; Mussard et al., 2003) esta hipótese foi sustentada, mas na medida em que os dados relativos a esta questão se acumulavam, os resultados sugeriam que um fator além do tamanho do folículo ovulatório poderia ter sido um determinante crítico da taxa de prenhez. Nestes experimentos a relação mais forte da taxa de prenhez foi com a diminuição nas concentrações de progesterona associadas com a regressão do corpo lúteo em resposta a prostaglandina  $F_2\alpha$  (PGF) frente a uma injeção de GnRH para sincronizar a ovulação (ou para uma ovulação espontânea, Tabela 1). Em um ciclo estral espontâneo, o intervalo desde a regressão lútea até o estro é denominado “proestro”. Nos programas de IATF e em nossos experimentos, definimos “proestro” como o intervalo da PGF (e retirada do CIDR quando for o caso) até a administração de GnRH. Nos Experimentos 1, 2 e 3 apresentados na Tabela 1, vacas induzidas a ovular folículos grandes tinham maior fertilidade. Através dos experimentos, entretanto, alguns grupos de vacas ovularam folículos relativamente grandes com proestro mais curto e vice versa. Quando observamos esta relação, foi desenhado o Experimento 4 (Tabela 1) de tal forma que o diâmetro dos folículos fosse mantido constante, mas a duração do proestro era variável (Bridges et al., 2009a). Dispondo estes dados da menor taxa de concepção para a maior, mostrou-se que o diâmetro do folículo não estava altamente correlacionado com a taxa de concepção através dos experimentos, mas na medida em que aumentava a duração do proestro o mesmo acontecia com a taxa de concepção. Além disso, o tamanho do folículo à ovulação pode não ser o melhor preditor para a sua “maturidade”, uma vez que os nossos dados sugerem que a duração do proestro dita com maior precisão sua fertilidade subsequente. O

efeito do tamanho do folículo ovulatório na ovulação induzida por GnRH ou no estro induzido sobre as taxas de prenhez foi estudado por Perry et al. (2003). Não houve efeito do tamanho do folículo sobre a taxa de prenhez quando a ovulação e a IA ocorreram depois do estro. Contudo, quando os animais foram induzidos a ovular com GnRH e receberam IATF, o tamanho do folículo tendeu a afetar a taxa de prenhez. Assim sendo, se ocorreu um proestro de “duração completa” (evidenciado por terminar em estro), o diâmetro do folículo ovulatório não teve influência. O diâmetro teve influência significativa somente quando a ovulação foi induzida por GnRH. Ao final destes experimentos, a nossa visão foi que a “maturidade do folículo” se estende muito além do diâmetro do folículo ovulatório, e estava relacionado com a duração do proestro. Este conhecimento foi aplicado ao desenvolvimento de um novo programa para IATF em vacas de corte nos Estados Unidos.

**Tabela 1.** Resumo da duração do proestro (d), diâmetro do folículo ovulatório (mm) e taxa de concepção (%) aos 30 dias (Experimentos 1, 2, 3 e 4)

Tratamento	PGF <sub>2α</sub> até o pico de LH	Diâmetro do folículo à ovulação	Taxa de concepção aos 30 dias
GnRH-10, Experimento 2	1,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	4
GnRH-10, Experimento 3	1,0 ± 0,1	11,1 ± 0,2	8
PE curto, Experimento 4	1,25	12,6 ± 0,2	10*
GnRH-13, Experimento 2	2,2 ± 0,1	13,6 ± 0,2	57
GnRH-13, Experimento 3	2,0 ± 0,2	13,7 ± 0,2	67
PE longo, Experimento 4	2,3	12,9 ± 0,2	71*
GnRH-10, Experimento 1	3,0 ± 0,1	10,7 ± 0,1	76
SPON, Experimento 1	3,0 ± 0,1	12,0 ± 0,3	100

**Legenda:** GnRH-10 = animais induzidos a ovular um folículo de 10 mm com GnRH; GnRH-13 = animais induzidos a ovular um folículo de 13 mm com GnRH; PE curto e PE longo = animais induzidos a ovular um folículo ~13mm depois de um período de proestro curto ou longo; SPON = animais que ovularam espontaneamente; \* inclui apenas as vacas com ciclo estral de duração normal.

## PROLONGANDO O PROESTRO PARA AUMENTAR A TAXA DE PRENHEZ À IATF

Alguns anos atrás, propusemos que se pudessemos alterar o programa de sincronização primária que é usado para IATF nos Estados Unidos em bovinos de corte para aumentar a duração do proestro, o resultado seria aumento na taxa de prenhez à IATF. O programa tradicional é o programa 7 d CO-Synch + CIDR. Com ele, o GnRH é administrado quando o CIDR é colocado no dia -7. No dia 0, o PGF é administrado e o CIDR retirado. Tem sido demonstrado repetidas vezes que no programa de 7 dias o intervalo ideal de PGF a GnRH (proestro) e IATF é 60 a 66 h (isto é, a duração do proestro). Com esta abordagem, o folículo ovulatório começa a crescer no dia -6 a -5, e este tempo de emergência determina o momento adequado para a administração de GnRH. Teorizamos que se reduzirmos o intervalo da inserção do CIDR até o PGF, poderíamos conseguir aumentar a duração do proestro. Assim, desenvolvemos o programa 5 d CO-Synch + CIDR. Neste programa, o CIDR foi colocado no dia -5 e GnRH é administrado neste momento. Cinco dias mais tarde, o CIDR é retirado e são dadas duas injeções de PGF com 2 a 12 h de intervalo. Através de uma série de experimentos, determinamos que o intervalo mais efetivo desde a retirada do CIDR até o segundo GnRH e IATF é 72 h. Com esta abordagem, o novo folículo emerge entre o dia -4 e -3, e o CIDR é retirado (e o corpo lúteo regride)

mais cedo, em relação à emergência do folículo ovulatório. Esta alteração nos permitiu aumentar a duração do proestro de 60 para 72 h. Testamos o programa 5 d CO-Synch + CIDR em experimentos que incluíram mais de 1.700 vacas. O programa 5 d CO-Synch + CIDR aumentou a taxa de prenhez à IATF em 10,5% em comparação com o programa tradicional 7 d CO-Synch + CIDR (Tabela 2; Bridges et al., 2008). De forma similar, aumento de 14% na taxa de prenhez à IATF foi detectado em novilhas de sobreano com o programa de 5 d comparado com o de 7 d (Wilson et al., 2007). Este aumento substancial na taxa de prenhez à IATF com o programa 5 d foi alcançado com o uso de duas doses de  $\text{PGF}_2\alpha$  (25 mg/dose; PGF) ou seu análogo, cloprostenol sódico (500  $\mu\text{g}$ /dose; CLP), com intervalo entre 2 a 12 h. Quando as vacas receberam apenas uma única dose PGF (1XPFG) ou CLP (1XCLP) no programa de 5 d, a taxa de prenhez à IATF foi reduzida de 15 a 17% quando comparado com o programa de 5 d com o tratamento 2XPFG (Kasimanickam R., et al. 2008). Tentamos corrigir esta redução na taxa de prenhez adiando a IATF para 84 h quando 1XCLP foi usado com o programa de 5 d (Souto et al., 2009). Entretanto, a taxa de prenhez à IATF ainda tendia a ser menor com o tratamento 1XCLP do que com 2XPFG. Em outro experimento, comparamos a capacidade de 2XPFG e 1XCLP de induzir a regressão lútea (Souto et al., 2009). Foi demonstrado que as concentrações de progesterona foram mais altas depois do tratamento 1XCLP do que 2XPFG como resultado da falha ou regressão tardia do CL em 39% (9/23) das vacas neste tratamento. Por isso, acreditamos que a redução das taxas de prenhez à IATF que vemos com um único tratamento PGF ou CLP seja o resultado da falha na regressão lútea em algumas vacas devido ao menor intervalo entre o primeiro GnRH e o tratamento PGF/CLP. Alcançamos o objetivo global desta área do estudo aumentando a taxa de prenhez à IATF de 50 a 60% para quase 70%. Concluimos que tirar proveito da melhor taxa de prenhez à IATF que é alcançada com o programa 5 d em vacas no pós-parto são necessárias duas doses de PGF ou CLP.

**Tabela 2.** Resumo dos dados em vacas no pós-parto usando o tratamento CO-Synch + CIDR de 5 d ou 7 d com diversos tratamentos luteolíticos e momento da IA.

Protocolo de sincronização <sup>a</sup> Tratamento luteolítico <sup>b</sup>	5CO-72 2XPFG	7CO-60 2XPFG	5CO-72 1XPFG	5CO-72 1XCLP	5CO-84 1XCLP
Bridges et al., 2008 (n = 216)	80,0	66,7	-	-	-
Bridges et al., 2008 (n = 400)	65,3	56,2	-	-	-
Cruppe et al., não publicado (n = 254)	59,4	-	-	-	-
Bridges et al., não publicado (n = 194)	74,2				-
Souto et al., 2009 (n = 254)	69,0	-	-	-	57,9
Kasimanickam et. al., 2008 (n = 830)	69,0	-	52,0	54,3	-
Total (n = 2148)	68,2	-	-	-	-

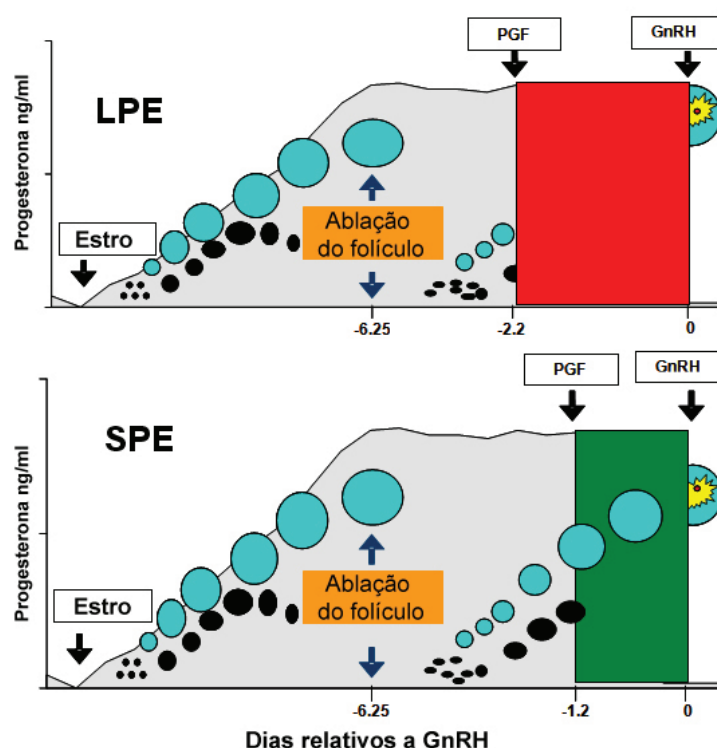
<sup>a</sup>Programa CO-Synch+CIDR, 5 d CIDR = 5CO, 7 d CIDR = 7CO. O número depois do travessão (por exemplo 5CO- 72) indica o tempo de tratamento com GnRH e IATF depois da retirada do CIDR.

<sup>b</sup>2XPFG =  $\text{PGF}_2\alpha$  (25 mg) ou cloprostenol sódico (500  $\mu\text{g}$ ) administrado na retirada do CIDR e uma segunda dose entre 2 e 12 h mais tarde; 1XPFG = uma dose de  $\text{PGF}_2\alpha$  administrada na retirada do CIDR; 1XCLP = uma dose de cloprostenol sódico administrada na retirada do CIDR.

## ALTERAÇÕES HORMONAIS COM UMA PROESTRO PROLONGADO

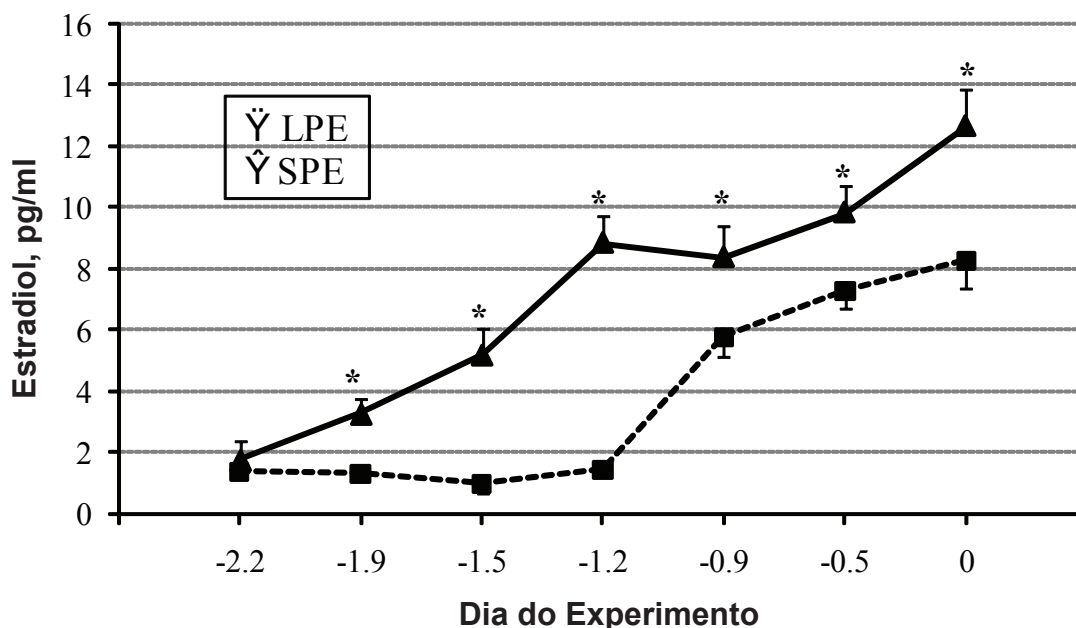
O proestro começa com a remoção das fontes de progesterona (um CL, um CIDR ou ambos) e termina com um pico de LH espontâneo ou induzido por GnRH. As concentrações de progesterona diminuem rapidamente até níveis muito baixos e permanecem em nível basal durante todo o proestro. Esta redução na

progesterona desencadeia uma série de alterações hormonais que podem ter efeitos profundos sobre o sistema reprodutivo. Uma resposta quase imediata frente à progesterona em declínio é o aumento na frequência dos pulsos de LH. A liberação de LH da hipófise anterior é regulada principalmente pela progesterona e estradiol e a associação negativa da progesterona e a secreção de LH está bem estabelecida (Kinder et al., 1996). O proestro é caracterizado pelos pulsos de LH em uma frequência crescente à medida que o proestro progride e o pico de LH se aproxima (Imakawa K, et al., 1986). A secreção pulsátil de LH é o fator primário que leva ao desenvolvimento final do folículo ovulatório. Durante o proestro espontâneo, o crescimento do folículo ovulatório e a produção de estradiol pelas células da granulosa do folículo aumentam com o progresso do proestro. Pesquisamos as mudanças nas concentrações de estradiol quando manipulamos a duração do proestro (Figura 1; Bridges et al., 2009a). No mesmo estudo, foram avaliadas a amplitude do pico de LH induzido por GnRH e as concentrações de progesterona durante o diestro subsequente. Os tratamentos de proestro curto (SPE; n = 8) e longo PE (LPE; n = 8) estão descritos na Figura 1. O tamanho do folículo ovulatório foi similar nos dois tratamentos e o pico de LH induzido por GnRH não foi diferente entre os tratamentos. Houve tendência para maior incidência de ciclos estrais curtos e menores concentrações de progesterona durante os ciclos estrais subsequentes no tratamento SPE do que no tratamento LPE. A diferença mais marcante entre os tratamentos, entretanto, foi que as concentrações de estradiol foram maiores no tratamento LPE do que no SPE durante as 32 horas que antecederam a administração de GnRH (Figura 2). Também comparamos a dinâmica folicular e as concentrações de estradiol entre o programa CO-Synch + CIDR 7 d e 5 d (Bridges et al., 2009b). O diâmetro do folículo ovulatório não foi diferente entre os programas de sincronização, mas as concentrações máximas de E2 durante o proestro tenderam a ser maiores com o programa 5 d. Concluímos que o impacto chave da maior duração do proestro é o aumento gradativo das concentrações pré-ovulatórias de estradiol em resposta a um período mais longo de estimulação por LH e demonstramos maiores concentrações de estradiol durante o proestro e uma maior taxa de prenhez à IATF no programa CO-Synch + CIDR de 5 d do que no de 7 d.



**Figura 1.** A abordagem experimental utilizada para induzir as vacas a ovular folículos de diâmetro similar depois de um proestro curto (SPE) ou longo (LPE).



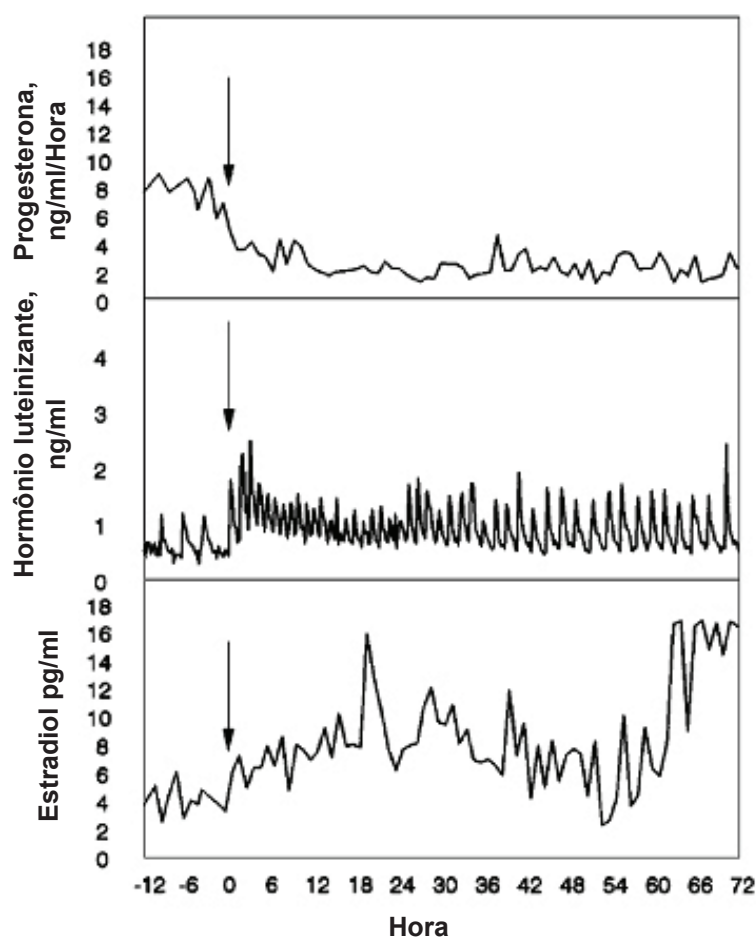


**Figura 2.** Concentrações de estradiol em vacas que tiveram um proestro longo (LPE) ou curto (SPE). Os tratamentos foram administrados como descrito na Figura 1.

## ABORDAGENS ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR A ESTIMULAÇÃO DA MATURAÇÃO FOLICULAR

Na nossa pesquisa, nos concentramos em prolongar o proestro para conseguir maior estimulação folicular pelo LH, que resulta em maiores concentrações pré-ovulatória de estradiol e aumento da fertilidade. Existem, entretanto, outras abordagens que têm o potencial de aumentar a estimulação folicular por gonadotropinas e levam ao mesmo resultado final. Estas abordagens incluem a redução parcial nas concentrações circulantes de progesterona, reduzindo o controle do feedback negativo da secreção de LH ou proporcionar gonadotropinas exógenas como eCG.

*Redução parcial nas concentrações de progesterona para aumentar a secreção endógena de LH.* Ao início do proestro, removemos por completo as duas fontes possíveis de progesterona, o CL e o CIDR, reduzindo a progesterona às concentrações basais e proporcionando ao folículo um período mais longo de exposição à maior secreção de LH que se segue. Contudo, a resposta da secreção de LH às concentrações de progesterona não é do tipo “tudo ou nada”, e é conhecido o fato de que a capacidade da progesterona de regular a frequência de pulsos de LH ocorre ao longo de uma sucessão de concentrações. Assim, por exemplo, se as concentrações estiverem reduzidas em 50%, há aumento mensurável na frequência do pulso de LH. Neste caso, a frequência de pulso não é tão grande quanto a que ocorre quando toda a progesterona está ausente, mas é suficiente para estimular o desenvolvimento folicular (Kinder et al., 1996). Esta relação foi mais claramente demonstrada pela administração de diferentes quantidades de progesterona para a mesma vaca ao longo do tempo e medindo as respostas de secreção de LH e estradiol (Figura 3; Kinder et al., 1996). Neste experimento, a secreção LH e as concentrações de estradiol eram menores nas vacas com concentrações altas de progesterona (~8 ng/ml) em comparação com as concentrações baixas (~2 ng/ml). Um grande número de experimentos demonstrou uma relação similar. Por isso, se os programas de sincronização de estro são delineados para resultar em concentrações menores de progesterona antes do início do proestro (isto é, antes da retirada do CIDR), o aumento resultante no LH deveria realçar a maturidade do folículo ovulatório e causar alterações correspondentes nas concentrações de estradiol e na fertilidade.



**Figura 3.** Respostas de LH e secreção de estradiol a concentrações circulantes de progesterona. A seta indica o momento da mudança de progesterona alta para baixa na h 0. A progesterona alta foi conseguida usando dois dispositivos intravaginais de liberação de progesterona. Para conseguir a progesterona baixa usou-se  $\frac{1}{2}$  do mesmo tipo de dispositivo. (Adaptado de Kinder et al., 1996. Journal of Animal Science 74:1424).

Há praticamente dois métodos que podem ser usados para reduzir parcialmente as concentrações de progesterona durante os programas de sincronização de estro. Uma abordagem é administrar PGF antes do final do tratamento com CIDR. Com isto, a contribuição do CL para as concentrações de progesterona é removida e o CIDR passa a ser a única fonte de progesterona durante todo o tempo em que permanecer na vagina. Por outro lado, poderia ser usado um CIDR que libera menos progesterona. Isto pode ocorrer com um CIDR usado anteriormente, porque a menor progesterona total no CIDR usado resulta em menor liberação de progesterona e concentrações sistêmicas menores. Estas duas abordagens foram usadas no Brasil e mostraram que aumentam as taxas de prenhez à IATF.

*Tratamento precoce com PGF para reduzir as concentrações de progesterona.* Quando PGF foi administrado no quarto dia de um programa 8-d EB-CIDR, a fertilidade destas vacas como receptoras de TE foi maior do que em vacas que receberam PGF no momento da retirada do CIDR (Moreno et al., 2002). Seguindo um raciocínio semelhante, foram comparadas as respostas reprodutivas entre vacas que receberam PGF no d 7 ou d 9 de um protocolo EB-CIDR-ECP de nove dias (Peres et al., não publicado). O tratamento com PGF no d 7 resultou em concentrações de progesterona acentuadamente reduzidas no d 9 (imediatamente antes da remoção do CIDR), folículo ovulatório de diâmetro maior quando a IATF foi realizada no d 11 (2 d depois da remoção do CIDR), e maior taxa de ovulação, concepção e taxas de prenhez

à IATF do que quando PGF era dada no d 9 (Tabela 3). A injeção de PGF no d 7 teria induzido a regressão lútea, deixando o CIDR como a única fonte de progesterona durante o período de 48 h do d 7 ao d 9. A redução resultante na progesterona seria antecipada para resultar em maior secreção de LH do d 7 ao d 9. Seria de se esperar que esta mudança no LH melhorasse a maturação folicular. O maior diâmetro e taxa de ovulação dos folículos ovulatórios quando PGF foi dado no d 7 apoia esta ideia. A abordagem usada neste experimento não aumentou tecnicamente a duração do proestro, mas os 2 d adicionais de concentrações menores de progesterona parecem ter alcançado o objetivo de aumentar a estimulação por LH recebida pelos folículos ovarianos antes da IATF. As concentrações de estradiol não foram medidas neste experimento mas seria lógico que a produção folicular de estradiol também esteja aumentada. Esta modificação aumentou a fertilidade em um programa IATF que é comum no Brasil.

**Tabela 3.** Respostas reprodutivas ao tratamento com PGF no d 7 ou no d 9 de um protocolo de sincronização EB-CIDR-ECP de nove dias em vacas Nelore não lactantes.

Tratamento	P4 no d 9 <sup>a</sup>	Diâmetro folículo <sup>b</sup>	Taxa ovulação	Taxa concepção <sup>d</sup>	Prenhez IATF <sup>e</sup>
d 7 PGF (n = 350)	3,1 ± 0,2	11,5 ± 0,2	85,4%	60,9%	52,0%
d 9 PGF (n = 352)	4,6 ± 0,2	10,8 ± 0,2	77,0%	47,2%	36,4%

<sup>a</sup>Concentrações de progesterona (ng/ml) no momento da retirada do CIDR no d 9.

<sup>b</sup>Diâmetro (mm) do folículo presente à IATF no d 11 (2 d depois da retirada do CIDR).

<sup>c</sup>Vacas que ovularam depois da retirada do CIDR em resposta ao programa de sincronização.

<sup>d</sup>Proporção de vacas que ovularam que conceberam à IATF.

<sup>e</sup>Proporção de todas as vacas no experimento que engravidaram com IATF.

*Redução de progesterona com um CIDR usado:* Tem sido demonstrado diversas vezes que o CIDR usado pela segunda ou terceira vez resulta em menores concentrações de progesterona na circulação. Por isso, se as fêmeas bovinas receberam um CIDR usado em um programa de sincronização, é possível que a secreção de LH e a extensão da maturação folicular seriam maiores do que naquelas que receberam um CIDR novo. A amplitude desta diferença sofreria a interferência da presença ou ausência de um CL no momento da colocação do CIDR. Em duas vacas com um CL, as concentrações seriam relativamente elevadas antes da colocação do CIDR e a diferença refletirá apenas a diferença em progesterona adicional fornecida pelo CIDR. Por outro lado, nas vacas sem CL (como as vacas em anestro, por exemplo), a única fonte de progesterona seria o CIDR e a diferença nas concentrações seria determinada apenas pela progesterona liberada pelo CIDR e seria mais pronunciada. Os efeitos do 1º, 2º ou 3º uso do CIDR sobre a fertilidade foram pesquisados em novilhas Nelore (Dias et al. não publicado e Peres et al. não publicado). Em novilhas que receberam PGF no d 7 de um programa EB-CIDR-ECP de nove dias, as concentrações de progesterona no d 7 foram menores do que em novilhas que receberam um CIDR de 1º uso (Tabela 4). O diâmetro do maior folículo presente à IATF, a taxa de concepção e a taxa de prenhez à IATF foram maiores com o tratamento com CIDR de 3º uso do que de 1º uso (Tabela 4). Por isso, a redução das concentrações de progesterona com um dispositivo CIDR usado anteriormente foi uma abordagem eficaz para aumentar a taxa de prenhez à IATF. Ainda que as concentrações de progesterona fossem diferentes no d 7 entre os tratamentos, seria de se esperar que a influência do tipo de CIDR fosse mais pronunciada depois que a progesterona do CL fosse removida da circulação, induzindo sua regressão no d 7 com PGF. Em um segundo estudo, novilhas Nelore receberam CIDR de primeiro e de terceiro uso em um programa EB-CIDR-ECP de nove dias, mas PGF não foi administrada antes do d 9 (Peres et al. não publicado). O tipo do CIDR influenciou o diâmetro do folículo e as concentrações de progesterona, mas as diferenças na taxa de concepção e de prenhez foram



relacionadas à concentração de progesterona no d 9 mais do que com o tipo de CIDR. Com base nestes dados, parece que para se tirar pleno proveito de um CIDR já usado em novilhas Nelore, seria necessário o tratamento com PGF antes da retirada do CIDR, o que é consistente com outras abordagens que se acredita aumentem a estimulação do desenvolvimento folicular pelo LH.

**Tabela 4.** Respostas reprodutivas com CIDR de 1º uso, 2º uso ou 3º uso durante um protocolo de sincronização EB-CIDR-ECP de nove dias em que PGF foi administrado no d 7 a novilhas Nelore.

Tratamento	P4 no d 7 <sup>a</sup>	Diâmetro Folículo <sup>b</sup>	Taxa ovulação <sup>c</sup>	Taxa concepção <sup>d</sup>	Prenhez IATF <sup>e</sup>
1º Uso (n = 121)	3,0 ± 1,9	10,1 ± 2,0	70,5%	37,2%	20,5%
2º Uso (n = 109)	2,3 ± 1,6	10,6 ± 2,3	72,7%	37,8%	22,7%
3º Uso (n = 106)	2,0 ± 1,2	11,0 ± 2,1	78,2%	53,2%	35,5%

CIDR de 1º uso eram novos, CIDR de 2º uso tinham sido usados anteriormente por 9 d e CIDR de 3º uso tinham sido usados anteriormente por 18 d.

<sup>a</sup>Concentrações of progesterona (ng/ml) no momento da administração de PGF no d 7.

<sup>b</sup>Diâmetro (mm) do folículo presente à IATF no d 11 (2 d depois da retirada do CIDR).

<sup>c</sup>Novilhas que ovularam depois da retirada do CIDR em resposta ao programa de sincronização.

<sup>d</sup>Proporção de novilhas que ovularam que conceberam à IATF.

<sup>e</sup>Proporção de todas as novilhas no experimento que emprenharam à IATF.

*Tratamento com eCG ou desmame temporário para aumentar a estimulação gonadotrópica dos folículos ovarianos.* O objetivo da manipulação da duração do proestro e/ou concentrações de progesterona é aumentar o desenvolvimento folicular e a fertilidade pela intensificação da secreção de LH endógena. Por outro lado, a administração de gonadotropinas exógenas no intervalo apropriado antes da IATF deveria ser uma abordagem viável para alcançar a mesma meta. A maior parte do trabalho deste tipo tem sido realizada usando eCG por causa de sua dupla ação gonadotropina e longa meia vida. Vacas de corte foram tratadas com 400 UI de eCG no 5º dia de um programa EB-CIDR de 8 dias para aumentar exogenamente a estimulação gonadotrópica dos folículos ovulatórios (Tribulo et al., 2002). A taxa de prenhez destas vacas, quando usadas como receptoras de TE, foi maior do que em vacas que não receberam eCG. Também foi mostrado que administrar eCG exógena à retirada do CIDR em um programa de sincronização EB-CIDR melhora as IA taxas de prenhez à IA e aumenta a secreção de progesterona pelo CL subsequente (Baruselli et al., 2004). Recentemente foi testada a influência de eCG administrada no d 9 de um programa EB-CIDR-ECP de nove dias em novilhas e vacas Nelore (Peres et al. não publicado; Tabela 5). Em comparação com novilhas e vacas que receberam tratamentos idênticos de sincronização mas sem injeção de eCG, a injeção de 300 UI de eCG aumentou o diâmetro do folículo ovulatório, a taxa de ovulação e a taxa de prenhez à IATF tanto em novilhas como em vacas. Esta abordagem não altera as concentrações de progesterona durante a sincronização nem a duração do proestro para causar maior secreção de LH, mas em vez disso o maior estímulo gonadotrópico é obtido exogenamente com eCG. O resultado é o mesmo, no sentido de que há melhora no crescimento folicular e na fertilidade.

**Tabela 5.** Respostas reprodutivas ao tratamento com eCG ao final de um protocolo de sincronização EB-CIDR-ECP de nove dias com novilhas e vacas não lactantes Nelore.

Tratamento eCG	Diâmetro foliculo <sup>b</sup>	Taxa ovulação <sup>c</sup>	Prenhez IATF <sup>d</sup>	P4 7 d depois IA <sup>e</sup>
Novilhas				
Sem eCG (n = 402)	11,5 ± 0,1	83,8%	41,3%	2,8 ± 0,1
200 UI (n = 383)	11,9 ± 0,1	88,5%	47,0%	3,2 ± 0,1
300 UI (n = 368)	12,0 ± 0,1	94,3%	46,7%	4,9 ± 0,1
Vacas				
Sem eCG (n = 352)	11,0 ± 0,2	37,5%	72,4%	3,2 ± 0,1
300 UI (n = 350)	11,5 ± 0,2	50,8%	90,0%	4,6 ± 0,1

<sup>a</sup>Diâmetro (mm) do foliculo presente à IATF no d 11 (2 d depois da remoção do CIDR).

<sup>b</sup>Fêmeas que ovularam depois da remoção do CIDR em resposta ao programa de sincronização.

<sup>c</sup>Proporção de todas as novilhas no experimento que engravidaram à IATF.

<sup>d</sup>Concentrações de progesterona (ng/ml) 7 d depois da IATF.

Em vacas de corte no período após o parto, o estado nutricional e a amamentação podem ser os fatores mais importantes na inibição da ovulação. Rasby et al. (1992) mostraram que a restrição nutricional tem influência negativa sobre a liberação de LH em vacas de corte no pós-parto. A frequência de pulsos de LH também é inibida pelo estímulo do bezerro mamando (Williams et al., 1996). Pode ser conseguida maior frequência de pulsos de LH restringindo a amamentação ou promovendo o desmame temporário em vacas com menos de 30 dias após o parto (para revisão, ver Yavas & Walton, 2000). A taxa de prenhez foi aumentada em aproximadamente 22% depois da remoção do bezerro entre o momento de retirada de um dispositivo P4 e IATF (Barreiros et al., 2003).

Meneguetti et al. (não publicado) compararam o efeito de eCG e/ou o desmame temporário em vacas de corte em anestro. Vacas tratadas com eCG ou desmame temporário tiveram taxas de prenhez maiores do que as que não receberam o eCG ou não tiveram o desmame. Contudo, não foi observado nenhum efeito aditivo em termos de taxa de prenhez em vacas que receberam ambos, eCG e desmame temporário. Este achado sugere que o desmame temporário ou o eCG são valiosas ferramentas para aumentar a fertilidade, mas não há benefício adicional se as duas tecnologias forem usadas.

*Interação abordagens para aumentar a estimulação da maturidade folicular.* Nos experimentos descritos anteriormente (Dias et al., não publicado; Peres et al. não publicado) também foram testadas diversas combinações das abordagens que são descritas acima individualmente. Foram observadas interessantes interações entre as diversas abordagens que aumentam a fertilidade e a maturidade folicular. Em novilhas, por exemplo, a eCG aumentou a taxa de prenhez em novilhas que receberam um CIDR de 1º uso mas não no de 3º uso, e em novilhas que receberam PGF no d 9, mas não no d 7 do programa de sincronização (Dias et al., não publicado). Assim, a eCG foi mais benéfica quando os tratamentos resultaram em maiores concentrações de progesterona ao final do programa de sincronização. Em diversos casos, foram observadas interações das concentrações de progesterona com o crescimento folicular, taxa de ovulação e taxa de prenhez à IATF. Estas relações ajudam a enfatizar a importância do grau de estimulação folicular que é recebida antes da IATF.

## CONCLUSÕES

A maturidade folicular é melhor definida pelo grau de estímulo gonadotrópico que o folículo recebe antes da ovulação. O prolongamento do proestro aumenta a duração da estimulação do folículo ovulatório, as concentrações pré-ovulatórias de estradiol e a fertilidade. A modificação dos programas de sincronização com base em GnRH para aumentar a duração do proestro melhora de forma substancial a taxa de prenhez de IATF. A modificação dos programas EB-CIDR para reduzir as concentrações de progesterona durante o programa de sincronização ou para aumentar o estímulo gonadotrópico durante o proestro com eCG ou o desmame temporário também melhoram a taxa de prenhez à IATF. Com a evolução das tecnologias para o controle dos ciclos estrais em bovinos, atenção à necessidade de assegurar uma estimulação adequada da função folicular antes da ovulação passa a ser um requisito.

## REFERÊNCIAS

- Anderson, L. and P. Deaton. 2003. Economics of estrus synchronization and artificial insemination. Beef Improvement Federation Proceedings, Lexington, KY.
- Barreiros, T. R. R., M. M. Seneda, E. L. Reis, P. S. Baruselli, and C. M. Barros. 2003. Efeito do desmame temporário na sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Sci. Vet.* 31, 238-239 (abstract)
- Baruselli P. S., E. L. Reis, M. O. Marques, K. L. F. Nasser, and G. A. Bo. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:479-486.
- Bridges G. A., L. A. Helser, D. E. Grum, M. L. Mussard, C. L. Gasser, and M. L. Day. 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69:843-851.
- Bridges, G. A., M. L. Mussard, C. R. Burke and M. L. Day. 2009a. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* (Accepted).
- Bridges, G. A., M. L. Mussard, L. A. Helser, and M. L. Day. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7 d and 5 d CO-Synch + CIDR program in two-year old beef cows. To be presented at ADSA-CSAS-ASAS Joint Annual Meeting - Montreal, Canada, July 12-16/2009.
- Britt, J. H. 1987. Induction and synchronization. In: E. S. E Hafez (ed.) *Reproduction in farm animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- C. M. McDowell, L. H. Anderson, J. E. Kinder, and M. L. Day. 1998. Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci* 76:850-855.
- Diskin, M. G., and J. M. Sreenan. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.* 59:463-468.
- Geary, T. W., E. R. Downing, J. E. Bruemmer, and J. C. Whittier. 2000. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. *Prof. Anim. Sci.* 16:1-5.
- Geary, T. W., J. C. Whittier, and D. G. Lefever. 1998. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or Co-Synch protocol. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl.1); 278 Abstr. 1086.
- Geary, T. W., R. R. Salverson, and J. C. Whittier. 2001. Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79:2536-2541.

IBGE 1996: <http://www.ufpel.edu.br/nupeec/arquivos/modeloartigo.pdf>

- Imakawa, K., M. L. Day, D. D. Zalesky, M. Garcia-Winder, R. J. Kittok and J. E. Kinder. 1986. Regulation of Pulsatile LH Secretion by Ovarian Steroids in the Heifer. *J. Anim. Sci.* 63:162-168.
- Johnson, S. K., S. L. Fogleman, and R. Jones. 2003b. Comparison of breeding system costs for estrus-synchronization protocols plus artificial insemination versus natural service. Kansas State University Cattleman's Day 2003.
- Kasimanickam, R., M. L. Day, J. S. Rudolph, J. B. Hall and W. D. Whittier. 2008. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to Timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. *Theriogenology*, 71:762-767.
- Kinder, J. E., F. N. Kojima, E. G. M. Bergfeld, M. E. Wehrman, and K. E. Fike. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.* 74:1424-1440.
- Lamb, G. C., J. S. Stevenson, D. J. Kesler, H. A. Garverick, D. R. Broan, and B. E. Salfen. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F<sub>2</sub> for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79:2253-2259.
- Larson, J.E. et al. 2006. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F<sub>2</sub>alpha, and progesterone. *J. Anim. Sci.* 84:332.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84:1277-1293.
- Miller, B. G. and N. W. Moore. 1976a. Effects of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. *J. Reprod. Fertil.* 46:535-536.
- Miller, B. G. and N. W. Moore. 1976b. Progesterone and oestrogen requirements for the survival of embryos in the ovariectomized ewe. *J. Reprod. Fertil.* 46:536-537.
- Miller, B. G., and N. W. Moore. 1983. Endometrial protein secretion during early pregnancy in entire and ovariectomized ewes. *Reprod. Fertil.* 68:137-144.
- Moore, N. W. 1985. The use of embryo transfer and steroid hormone replacement therapy in the study of prenatal mortality. *Theriogenology* 23:121-129.
- Moreno, D., L. Cutaia, H. Tribulo, R. Tribulo, M. L. Villata, M. Caccia and G. Bo. 2002. Effect of time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. *Theriogenology* 57:552.
- Mussard, M. L., C. R. Burke and M. L. Day. 2003. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. *Proceedings of the Ann. Conf. of the Soc. for Theriogenology*: 179-185.
- Mussard, M. L., C. R. Burke, E. J. Behlke, C. L. Gasser, and M. L. Day. 2007. Influence of premature induction of an LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.* (In Press): doi:10.2527/jas.2006-592.
- NAHMS. 1997. Part 1: Reference of 1997 beef cow-calf management practices. Available: <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/naahs/nahms/beefcowcalf/Beef97/bf97pt1.pdf>