



PALMER DE CASTRO SAMPAIO

**USO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA
EQUINA E PROGESTERONA INJETÁVEL EM
PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
EM TEMPO FIXO EM VACAS HOLANDESAS**

LAVRAS – MG

2013

PALMER DE CASTRO SAMPAIO

**USO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA E
PROGESTERONA INJETÁVEL EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM VACAS HOLANDESAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra. Nadja Gomes Alves

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Sampaio, Palmer de Castro.

Uso da gonadotrofina coriônica equina e progesterona injetável
em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas
holandesas / Palmer de Castro Sampaio. – Lavras : UFLA, 2013.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Nadja Gomes Alves.

Bibliografia.

1. Vacas holandesas - Taxa de prenhez. 2. Vacas holandesas -
Suplementação de progesterona. 3. Vacas holandesas - Eficiência
reprodutiva. 4. Vacas holandesas - Corpo lúteo. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.208245

PALMER DE CASTRO SAMPAIO

**USO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA E
PROGESTERONA INJETÁVEL EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM VACAS HOLANDESAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADO em 19 de julho de 2013.

Dr. José Camisão de Souza UFLA

Dr. José Nélio de Souza Sales UFPB

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo UFLA

**Dra. Nadja Gomes Alves
UFLA
(Orientadora)**

Lavras - MG

2013

DEDICO

*Aos meus pais, Mauro e Sônia, ao meu irmão, Taiguara,
as minhas irmãs, Guatana e Tamara, pelo amor, carinho e incentivo.
Aos meus avós, Maria, Mauro (in memoriam), Tereza e João pelo exemplo de
vida.
A minha noiva, Gabrielle, pelo amor, apoio e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela oportunidade de alcançar mais um objetivo em minha vida.

Aos meus pais, Mauro e Sônia, e aos meus irmãos, Guatana, Taiguara e Tamara pelo apoio incondicional, amor, total confiança em meu trabalho. AMO VOCÊS...

A minha noiva, Gabrielle, pelo amor, apoio, paciência e compreensão nos momentos de minha ausência. TE AMO!

A minha orientadora, professora Nadja Gomes Alves, pela confiança e orientação no campo da pesquisa, e mais importante, pelos conselhos no campo ético-profissional que me fizeram amadurecer. E também pela paciência que teve com seu orientado sempre teimoso.

Ao professor, Renato Ribeiro Lima, por todo trabalho e paciência em realizar as análises estatísticas.

Aos meus coorientadores e também amigos, Marcos Neves Pereira e José Camisão, por me ensinar a ter paixão pela profissão que escolhi, pelos grandes ensinamentos, apoio e confiança.

A meu amigo José Nélio Sales, pelo apoio, pelos conselhos, pela aprendizagem e grande ajuda durante o mestrado.

Ao membro da banca examinadora, Márcio Zangeronimo, pelo aprendizado e participação.

Ao amigo e professor Sandro César Salvador pela valiosa contribuição em minha profissionalização na área que escolhi atuar.

Ao meu amigo, médico veterinário, Régis Carvalho, que abriu as portas das fazendas para que este trabalho pudesse ser realizado. Pelos conselhos, apoio e confiança no meu trabalho.

Aos proprietários, Moisés e Luciano Lemos (Fazenda Recanto do Grão Mogol) e Carlos Augusto Pereira (Fazenda Santa Rita), que permitiram a utilização de seus rebanhos e forneceram grande ajuda na realização do meu experimento.

Aos funcionários das fazendas, Gustavo “miquim”, João Miguel, Júlio, João (*in memoriam*), Pedrinho e Joselei, que estavam sempre prontos a ajudar e colaboraram muito para que esse trabalho fosse concluído.

À Alessandra Teixeira, pelo apoio e total confiança.

À empresa Ouro Fino pelo fornecimento de todo material hormonal.

Ao professor Guilherme (Unesp-Araçatuba) e a Devani pela valiosa colaboração na realização das análises de progesterona.

Aos amigos do Grupo do Leite, que estiveram presentes durante toda minha caminhada acadêmica. Valeu galera. Desejo sucesso a todos.

Aos amigos de Lavras e a todos os amigos da República Morada Caipira por todos os anos de convivência, sendo minha segunda família em Lavras.

Aos colegas e amigos de pós-graduação pela ajuda e enriquecimento da minha formação através de suas experiências.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realizar este trabalho, e à CAPES pela ajuda financeira durante todo o mestrado.

E, finalmente, e em especial às caras amigas vacas de leite, as quais eu devo todo meu respeito, por toda aprendizagem, paciência e, sem dúvida, pelo companheirismo....

Agradeço a todos de coração...

RESUMO

A concentração sérica de progesterona e as taxas de prenhez e de perda embrionária foram avaliadas em vacas leiteiras submetidas a protocolo de inseminação artificial (IA) em tempo fixo à base de estradiol e progesterona (P_4) e tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e/ou P_4 injetável. O protocolo de sincronização consistiu no uso de um implante de P_4 por oito dias, administração de benzoato de estradiol no dia de início do protocolo (D0), de $PGF_{2\alpha}$ no D7 e de cipionato de estradiol no D8. A IA foi realizada em tempo fixo no D10. No D8 do protocolo as vacas foram alocadas aleatoriamente a um de quatro tratamentos em delineamento fatorial 2x2: Grupo controle – sem eCG e sem P_4 (n=104); Grupo eCG – 400 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona (n=93); Grupo P_4 – 600 mg de P_4 no terceiro dia após a IA (n=106); Grupo eCG + P_4 – 400 UI de eCG e 600 mg de P_4 (n=95). A concentração sérica de P_4 foi quantificada nos dias três, quatro e 13 após a IA. As vacas foram examinadas por ultrassonografia 32 dias após a IA para diagnóstico de gestação e aos 46 dias para avaliação de perda embrionária. A interação entre eCG e P_4 injetável não foi significativa ($P>0,05$) na análise de qualquer das variáveis. A administração de eCG não resultou em aumento da concentração sérica de P_4 e da taxa de prenhez e não reduziu a perda embrionária ($P>0,05$). O uso de P_4 injetável três dias após a IA aumentou ($P<0,01$) a concentração sérica de P_4 24 horas após a administração em comparação às vacas não tratadas ($3,43\pm 0,23$ vs $1,22\pm 0,50$ ng/mL), mas esse efeito não foi observado no dia 13 após a IA ($P>0,05$). O tratamento com P_4 injetável não influenciou as taxas de prenhez e de perda embrionária ($P>0,05$). Em conclusão, a adição de 400 UI e/ou 600 mg de P_4 no protocolo de IATF foi ineficiente em aumentar a taxa de prenhez ou diminuir a perda embrionária.

Palavras-chave: Eficiência reprodutiva. Taxa de prenhez. Suplementação de progesterona. Corpo lúteo.

ABSTRACT

Serum concentrations of progesterone and pregnancy rates and embryonic loss were evaluated in dairy cows submitted to the protocol for artificial insemination (AI) fixed-time base to estradiol and progesterone (P₄) and treated with equine chorionic gonadotropin (eCG) and/or P₄ injection. The synchronization protocol consisted in an implant use P₄ per eight days, administration of estradiol benzoate on the initiation day of the protocol (D0), of PGF_{2α} on D7 and estradiol cypionate on D8. The AI was performed at fixed time on D10. On D8 of the protocol cows were randomly allocated to one of four treatments in a 2x2 factorial: Control group - without eCG and without P₄ (n= 104); Group eCG - 400 IU of eCG at progesterone device removal (n= 93); Group P₄ - 600 mg of P₄ on the third day after AI (n= 106); Group eCG + P₄ - 400 IU of eCG and 600 mg of P₄ (n= 95). The serum concentration of P₄ was quantified on the days three, four and 13 after AI. Cows were examined by ultrasonography 32 days after AI to pregnancy diagnosis and on day 46 for evaluation of embryonic loss. The interaction between eCG and P₄ injection was not significant (P>0.05) in the analysis of any variables. The administration of eCG did not result in increased serum concentrations of P₄ and pregnancy rate, and did not reduce embryonic loss (P>0.05). The use of P₄ injection three days after AI increased (P>0.01) the serum concentration of P₄ 24 hours after administration compared to untreated cows (3.43±0.23 vs 1.22±0.50 ng/mL), but this effect was not observed on day 13 after AI (P>0.05). The treatment with P₄ injection did not influenced pregnancy rate and embryonic loss (P>0.05). In conclusion, the addition of 400 IU and/or 600 mg of P₄ in the protocol IATF were ineffective in increasing the pregnancy rate and decrease embryo loss.

Keywords: Reproductive efficiency. Pregnancy rate. Progesterone supplementation. *Corpus luteum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração sérica de progesterona (média±erro-padrão) nos dias três, quatro e 13 após IA.....	57
Tabela 2 Risco de prenhez aos 32 dias em vacas holandesas sincronizadas com protocolos à base de estradiol e progesterona e tratadas com eCG e ou progesterona.....	58
Tabela 3 Taxa de prenhez no dia 46 e taxa de perda embrionária em vacas holandesas sincronizadas com protocolo à base de progesterona e estradiol e tratadas com eCG e ou progesterona	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Possíveis fatores que influenciam o desempenho reprodutivo.....	13
2.2	Dinâmica folicular ovariana	18
2.3	Protocolos de sincronização de estros e da ovulação.....	19
2.4	Uso de estradiol nos protocolos de sincronização.....	21
2.5	Gonadotrofina coriônica equina (eCG).....	24
2.6	Suplementação com progesterona.....	28
2.7	Hipóteses	32
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	33
	REFERÊNCIAS	34
	ARTIGO.....	47
	Estratégias para aumentar a concentração sérica de progesterona no início do desenvolvimento embrionário de vacas holandesas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo	47
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Animais e manejo.....	52
2.2	Mensuração da produção de leite e avaliação da condição corporal.....	52
2.3	Delineamento experimental.....	53
2.4	Coleta de sangue e análise de progesterona	54
2.5	Diagnóstico de gestação	55
2.6	Análises estatísticas.....	55
3	RESULTADOS	57
4	DISCUSSÃO.....	60
4	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se observado grande melhora na seleção genética de vacas leiteiras e no manejo técnico das propriedades. O resultado dessas práticas foi o aumento da produção de leite associado à redução da fertilidade dos animais. Segundo Lucy (2001), a reduzida fertilidade de vacas leiteiras de alta produção deve-se à combinação de uma variedade de fatores fisiológicos e de manejo que têm efeitos aditivos na eficiência reprodutiva. Entre esses fatores, destacam-se a reduzida expressão e detecção de estros, que consequentemente geram baixa taxa de serviço.

Com o intuito de resolver o problema da baixa taxa de serviço, foram criadas ferramentas e métodos de manejo reprodutivo, como o uso de protocolos hormonais que sincronizam o estro e a ovulação e possibilitam a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de detecção de estro. Apesar dos vários protocolos de IATF existentes, as taxas de concepção giram em torno de 35% e continuam a ser um problema, principalmente em vacas leiteiras de alta produção.

Tendo em vista que a baixa concentração sanguínea de estradiol antes da ovulação pode estar relacionada à reduzida taxa de concepção, a utilização de estrógenos em protocolos de sincronização de estros pode ser favorável à fertilidade. Estudos com vacas leiteiras e de corte demonstraram que a aplicação de estrógenos no final do protocolo de sincronização de estros, para induzir a ovulação, resultou em aumento da concentração desse hormônio no pró-estro e em maior taxa de prenhez (BARUSELLI et al., 2004; CERRI et al., 2004; SOUZA et al., 2007).

Outro fator relacionado à reduzida fertilidade das vacas leiteiras é a baixa concentração sanguínea de progesterona (P_4) após a inseminação artificial (IA). Alguns tratamentos podem ser usados no intuito de aumentar a concentração de P_4 após a IA, incluindo os que aumentam a secreção de P_4 pelo

corpo lúteo (CL) existente, os que induzem a formação de um CL acessório e os que aumentam a concentração sanguínea de P_4 por meio da suplementação direta desse hormônio. Nesse sentido, as pesquisas indicam a importância do uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de IATF para aumentar as taxas de ovulação e de prenhez (SÁ FILHO et al., 2010a; SALES et al., 2011; SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009). A eCG tem a capacidade de estimular o desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, aumentar o tamanho e a capacidade esteroidogênica do CL (PULEY et al., 2013).

A suplementação direta de P_4 após a IA também tem sido avaliada como uma ferramenta para aumentar a taxa de concepção e diminuir a perda embrionária precoce em vacas leiteiras. Animais que apresentaram elevada concentração de P_4 após cobertura tiveram aumento no comprimento do embrião (CARTER et al., 2008; GARRETT et al., 1988; SATTERFIELD; BAZER; SPENCER, 2006), na produção de interferon-*tau* (MANN; LAMMING, 1999; MANN; LAMMING., 2001) e na taxa de prenhez (McNEILL et al., 2006; STRONGE et al., 2005).

Dessa maneira, estratégias que promovam o crescimento do folículo dominante antes da ovulação e/ou que estimulem o desenvolvimento do CL e resultem em aumento na concentração sanguínea de P_4 no início do desenvolvimento embrionário podem aumentar a taxa de prenhez e diminuir as perdas embrionárias. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito da suplementação da eCG e/ou da P_4 injetável em protocolo de IATF à base de estradiol e P_4 sobre a concentração sérica de P_4 e as taxas de prenhez e de perda embrionária de vacas holandesas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Possíveis fatores que influenciam o desempenho reprodutivo

Tem sido relatado há várias décadas, por cientistas de todo o mundo, redução na fertilidade de vacas leiteiras de alta produção (BUTLER, 1998; LEROY et al., 2009). O sucesso obtido com o aumento da produção de leite dos rebanhos foi acompanhado por tendências negativas dos índices reprodutivos, como intervalo de partos, número de dias abertos e número de inseminações por prenhez (LEROY et al., 2009).

Washburn et al. (2002) estudando 561 rebanhos das raças Jersey e Holandês nos EUA, relataram aumento linear na produção de leite, entre os anos de 1976 e 1999. Em rebanhos Jersey, esse aumentou foi de 4.753 kg de leite/vaca/ano, entre 1976 e 1978, para 6.375 kg de leite/vaca/ano, entre 1997 e 1999. Em rebanhos Holandeses, esse aumentou foi de 6.802 kg de leite/vaca/ano, entre 1976 e 1978, para 8.687 kg de leite/vaca/ano entre 1997 e 1999. De 1976 a 1978, as vacas Jersey apresentaram, em média, 122 dias abertos e 1,91 serviços por concepção. Nesse mesmo período, as vacas Holandesas apresentaram 124 dias abertos e 1,91 serviços por concepção. O número de dias abertos aumentou para 152 e 168 dias em vacas Jersey e Holandesas, respectivamente, nos anos de 1997 a 1999. O número de serviços por concepção também aumentou, chegando a 2,94, em ambas as raças, no período de 1994 a 1996. A taxa de concepção em rebanhos de ambas as raças diminuiu cerca de 52% a 53%, no final da década de 1970, para, aproximadamente, 33% a 35%, no final da década de 1990, correspondendo a uma redução de aproximadamente 35%.

O custo de redução da fertilidade para a pecuária foi estimado em 600 milhões de dólares em 1979 (GERRITS et al., 1979 citado por BILBY, 2009). Esse custo é provavelmente subestimado para a pecuária leiteira de hoje, já que

houve declínio drástico na fertilidade desde esse ano (BILBY, 2009). Falhas reprodutivas perdem apenas para mastite, em termos de causa de descarte involuntário, o que enfatiza a importância econômica da concepção, nos primeiros 80 dias de lactação para obtenção de um parto por ano (BILBY et al., 2009; YAVAS; WALTON, 2000).

Existem diversos fatores que podem estar relacionados com a baixa fertilidade das vacas leiteiras, como por exemplo, alterações metabólicas necessárias para suprir a demanda de nutrientes para a produção de leite no início da lactação (BUTLER, 2003). Outras razões podem ser atribuídas ao anestro (RHODES et al., 2003), funcionamento inadequado do CL (LAMMING; DARWASH; BACH, 1989; LUCY, 2001), reduzida concentração sanguínea de esteroides ovarianos (SARTORI et al., 2004; VASCONCELOS et al., 1999), baixa taxa de concepção e aumento da mortalidade embrionária (AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999; SANTOS et al., 2004), além de diminuição na expressão e na detecção de estros (DRANSFIEL et al., 1998). Dessa forma, o declínio da eficiência reprodutiva parece ter razões multifatoriais e não está ligado unicamente ao aumento da produção de leite (LUCY, 2001).

A situação metabólica específica de vacas leiteiras de alta produção se resume em intenso direcionamento dos nutrientes do trato digestivo e das reservas corporais para a glândula mamária, que tem prioridade em relação aos outros sistemas orgânicos durante as primeiras semanas pós-parto (LEROY et al., 2009). A energia necessária para o desenvolvimento, maturação e ovulação do folículo, para formação do CL e para manutenção da fase inicial da gestação é desprezível se comparada à demanda energética para a produção de leite. Dessa forma, parece que os produtos de degradação do intenso metabolismo em vacas de alta produção podem ser os responsáveis pela deterioração das funções reprodutivas (LEROY et al., 2006).

Um dos principais fatores envolvidos nas falhas reprodutivas em vacas leiteiras é o atraso na retomada da ciclicidade pós-parto (ROCHE, 2006), que está relacionado ao BEN (Balanço Energético Negativo). Folículos dominantes de vacas em BEN necessitaram de mais tempo e de um tamanho maior para secretar a concentração de estradiol suficiente para desencadear a ovulação (BEAM, 1997). Butler et al. (2003) relataram que vacas leiteiras com BEN mais intenso (-12,2 Mcal/dia) no primeiro mês pós-parto apresentaram menor concentração sanguínea de estradiol e falha de ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto, em comparação àquelas com BEN menos intenso (-8,3 Mcal/dia).

A intensidade do BEN parece ser relacionada à secreção de P₄ pelo CL. Villa-Godoy et al. (1988) observaram que a concentração sanguínea desse hormônio aumentou nos primeiros dois a três ciclos ovulatórios pós-parto. No entanto, esse aumento foi menos expressivo nas vacas com BEN mais intenso. Britt (1991) propôs que os folículos ovarianos que são negativamente influenciados pela exposição ao BEN no início de seu desenvolvimento originam CL com menor capacidade de secreção de P₄. O plano nutricional também pode influenciar a secreção de P₄ pelo CL no pós-parto, sendo que o alto consumo de energia pode resultar em maior produção desse hormônio (ARMSTRONG et al., 2001).

A menor concentração sanguínea de esteroides ovarianos, normalmente observada em vacas de alta produção, provavelmente está relacionada à maior metabolização hepática, em virtude do maior fluxo sanguíneo para o fígado, decorrente do maior consumo de alimentos (WILTBANK et al., 2001). Sangsritavong et al. (2002) relataram que o fluxo sanguíneo para o fígado de vacas em lactação foi maior comparado ao das vacas não lactantes (1183 vs 757 L/h). Nesse mesmo estudo, as vacas em lactação tiveram menor concentração de estrógeno (265 vs 351 pg/mL) e P₄ (2,43 vs 3,53 ng/mL) na corrente sanguínea,

quando comparadas às vacas não lactantes. Apesar do maior volume de tecido lúteo nas vacas em lactação, comparadas às novilhas não lactantes, a concentração máxima de P_4 é claramente inferior (SARTORI et al., 2004). O metabolismo hepático dos esteroides em vacas lactantes comprometem a concepção (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995) e a qualidade embrionária (SARTORI et al., 2004), em comparação a novilhas.

Pesquisas recentes têm dado bastante atenção às baixas taxas de concepção (ROCHE, 2006) e às altas taxas de mortalidade embrionária precoce em vacas leiteiras de alta produção (MANN; LAMMING, 2001), que podem estar relacionadas à menor qualidade do oócito e do embrião nesses animais. Snijders et al. (2000) estudaram *in vitro* o desenvolvimento de ovócitos de vacas leiteiras de mérito genético alto e moderado para a produção de leite e relataram que ovócitos de vacas de alto mérito genético resultaram em produção significativamente menor de blastocistos, comparados aos de vacas com moderado mérito genético. Além dos efeitos observados na qualidade dos ovócitos, tem sido relatada produção significativamente maior de embriões com qualidade excelente por vacas não lactantes, em comparação às lactantes (WILTBANK et al., 2001). Leroy et al. (2005) relataram que a qualidade de embriões de vacas leiteiras em lactação (28,7kg de leite/dia) foi inferior com embriões mais escuros e contendo até 50% mais lipídeos intracelulares, se comparados aos embriões de novilhas leiteiras ou de vacas de corte não lactantes. Por isso, pode-se afirmar que a capacidade de desenvolvimento do ovócito e a qualidade do embrião são comprometidas em vacas leiteiras de alta produção (ROCHE, 2006).

A morte embrionária é a causa direta de fertilidade reduzida em rebanhos com repetições de estro (HUMBLLOT, 2001; VAN CLEEFF; DROST; THATCHER, 1991). Humblot (2001) sugeriu que a luteólise e o retorno ao estro antes do dia 24 após a cobertura pode estar ligado à perda embrionária precoce,

mas se o CL é mantido e o retorno ao estro ocorre depois de 24 dias, é indicativo de morte embrionária tardia. A mortalidade embrionária precoce há muito vem sendo relatada como um dos principais entraves à fertilidade. Tanabe e Casida (1949), trabalhando com vacas das raças Holandesa e Guernsey, observaram que 66% dos animais que repetiram estro sem anormalidades clínicas detectáveis tiveram zigotos fertilizados, e que aos 34 dias após o acasalamento, o percentual de animais que tiveram embriões normais havia decrescido para 23%. Hawk et al. (1955), trabalhando com vacas leiteiras *repeat-breeder* encontraram 58% de vacas com embriões viáveis no dia 16 após acasalamento e apenas 28% de embriões viáveis no dia 34.

Segundo Santos et al. (2004), as taxas de fertilização são similares entre vacas leiteiras lactantes e não lactantes, com média de 76,2% e 78,1%, respectivamente. Entre os dias cinco e seis após a IA, 65% dos ovócitos fertilizados são considerados viáveis em vacas lactantes, contudo, as taxas de concepção entre os dias 27 e 31 após a IA são geralmente em torno de 35-45%. Esses dados demonstram que há certa porcentagem de perda embrionária no início da gestação, e segundo os autores, pode ser atribuída a vários fatores. Alguns fatores seriam a ovulação de folículos persistentes, a deficiência de P₄, produção deficiente de proteínas endometriais e de fatores de crescimento no ambiente uterino para o desenvolvimento do embrião, além de alguns componentes dietéticos, doenças e *status* metabólico.

A duração e intensidade de estro podem também ter influência na baixa taxa de concepção de vacas de maior produção leiteira. Essas variáveis estão diretamente relacionadas à categoria dos animais (novilha ou vaca lactante) e à produção leiteira (SARTORI et al., 2012). Lopez et al. (2004) avaliaram a associação entre produção de leite e comportamento de estro e verificaram menor duração e intensidade (6,3 vs 8,8 aceites de monta) de estro nas vacas de maior produção de leite (>39,5 kg/dia) comparadas às de menor (<39,5 kg/dia).

Tal fato parece estar relacionado às menores concentrações circulantes de estradiol em vacas lactantes comparadas às novilhas e em vacas de maior produção de leite comparadas às vacas de menor produção (SARTORI et al., 2004).

2.2 Dinâmica folicular ovariana

Com o uso da ultrassonografia na década de 80 foi possível obter grandes avanços no estudo da fisiologia ovariana, particularmente na caracterização do padrão do crescimento folicular e das fases do ciclo estral. Sabe-se que o crescimento dos folículos ovarianos nas fêmeas bovinas se dá em ondas, geralmente duas ou três por ciclo, precedidas por um aumento na concentração sérica de hormônio folículo estimulante - FSH (ADAMS et al., 1992). Cada onda inicia com o crescimento de sete a 11 folículos primários em média. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo, estimula a liberação das gonadotrofinas, FSH e hormônio luteinizante (LH), pela hipófise. Via circulação sistêmica, as gonadotrofinas atingem os ovários e estimulam o desenvolvimento folicular. Nessa fase, chamada de recrutamento, todos os folículos são dependentes de FSH para a proliferação celular e para o aumento da capacidade esteroidogênica (KASTELIC, 2012).

Após a emergência de uma onda, os folículos crescem por aproximadamente três dias até alcançar a fase de seleção ou divergência, a qual ocorre quando um folículo cresce mais que os outros e se distingue dos demais, até atingir a fase de dominância (GINTHER et al., 2003). Conforme o folículo dominante cresce há produção gradativa de quantidades crescentes de estradiol. Nessa fase o folículo dominante passa a produzir um hormônio chamado inibina, que juntamente com o estradiol têm a função de reduzir a síntese de FSH pela

hipófise, sem qualquer efeito na produção do LH (KASTELIC, 2012). Concomitante à queda na concentração sanguínea de FSH, o folículo dominante adquire mais receptores para o LH e se torna dependente do LH para continuar crescendo, enquanto os demais folículos, denominados subordinados, com menor número de receptores de LH entram em atresia (ADAMS et al., 2008).

O folículo dominante continua a crescer por alguns dias após a divergência e produz grande quantidade de estradiol, que na ausência de P_4 , induz a liberação de um pico de GnRH, que por sua vez, induz um pico de LH. Com o aumento de LH o folículo dominante continua a crescer e o ovócito sofre maturação final, culminando em ruptura folicular e ovulação. A maturação final inclui a expansão do *cumulus*, a interrupção do contato entre as células da coroa radiata e da membrana do ovócito e formação do espaço perivitelino. No entanto, se houver um CL ativo, a concentração sanguínea de P_4 estará alta inibindo a liberação de LH (*Feed-back* negativo). Então, o folículo dominante começa a regredir e há o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular (KASTELIC, 2012).

2.3 Protocolos de sincronização de estros e da ovulação

O conhecimento da dinâmica folicular possibilitou a criação de protocolos hormonais que manipulam o ciclo estral dos animais com o intuito de aumentar a taxa de serviço e diminuir a necessidade de mão de obra para a detecção de estros. Atualmente, existem diversos protocolos de IATF com variações de hormônios e momentos de administração desses. Nos protocolos de IATF é necessário inicialmente sincronizar a emergência de uma nova onda folicular. Isso pode ser feito por indução de ovulação utilizando GnRH ou análogos, LH ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou por atresia folicular com o uso de uma associação de P_4 e estradiol. Em segundo lugar é necessário

controlar a fase progesterônica por meio do uso de $PGF2\alpha$ e estrógenos ou com uso de P_4 exógena de liberação lenta. Finalmente, em terceiro lugar, induzir a ovulação sincronizada do folículo dominante por meio da aplicação de GnRH, LH, hCG ou ésteres de estradiol, como benzoato de estradiol ou cipionato de estradiol (BARUSELLI; SALES; SÁ FILHO, 2010).

Pursley, Mee e Wiltbank (1995) criaram um protocolo hormonal (Ovsynch) com combinação de prostaglandina ($PGF2\alpha$) e GnRH, que permite a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para vacas de alta produção leiteira cíclicas, o Ovsynch tem apresentado bons resultados. Entretanto, a adição de um implante de P_4 ao protocolo entre os dias zero e sete parece ser benéfica, principalmente para as vacas anovulatórias (STEVENSON et al., 2006). O Heatsynch é outro protocolo que utiliza o tratamento com um éster de estradiol (cipionato de estradiol) como substituto ao GnRH do Ovsynch para induzir a ovulação (PANCARCI et al., 2002). Segundo os autores, apesar de resultar em taxa de concepção similar ao Ovsynch, o Heatsynch tem a vantagem de ter um custo mais baixo e de manejar os animais sempre no mesmo horário do dia.

Atualmente, a maioria dos protocolos de IATF utilizam dispositivos auriculares ou implantes vaginais contendo P_4 ou progestágenos associados ao tratamento com estradiol para sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e posterior ovulação para realização da IATF (BÓ et al., 1995). O protocolo de IATF à base de ésteres estradiol e P_4 causa *feedback* negativo no hipotálamo, provocando redução na secreção de GnRH e, conseqüentemente, de FSH e de LH, o que promove regressão fisiológica do folículo dominante cerca de 36 h após o tratamento (BURKE et al., 2003), e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente três a quatro dias (BÓ et al., 1995). O uso de protocolos à base de estradiol e P_4 em vacas leiteiras foi descrito por Souza, Viechnieski e Lima (2009). Esse

protocolo consistiu na inserção de um dispositivo de P₄ e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol no dia zero, com retirada do implante de P₄ no dia oito, juntamente com a aplicação de PGF_{2α} e 1 mg de cipionato de estradiol, e realização da IA no dia 10 do protocolo. A taxa de ovulação desse protocolo varia de 60% (MONTEIRO JÚNIOR et al., 2012) a 70% (SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009) em vacas de alta produção.

Monteiro Júnior et al. (2012), trabalhando com vacas holandesas de alta produção (33,8 kg de leite), que foram submetidas ao protocolo de estradiol e P₄, observaram que as vacas as quais tiveram a onda sincronizada efetivamente e ovularam ao final do protocolo (60%) apresentaram taxa de concepção de 56%. No entanto, analisando 40% dos animais que não apresentaram uma sincronização eficiente, foi constatado que 22% não ovularam ao fim do protocolo e que 18% ovularam folículos persistentes. A taxa de concepção dos animais que ovularam folículos persistentes foi de apenas 26%. Pereira et al. (2012), trabalhando com vacas holandesas de alta produção observaram aumento na taxa de concepção de 18% para 32% quando se aumentou o proestro de dois para três dias, considerando a PGF_{2α} administrada no D8 ou no D7 do protocolo, respectivamente.

2.4 Uso de estradiol nos protocolos de sincronização

O estradiol é um hormônio esteroide produzido, principalmente, nos folículos dominantes, nos ovários, por uma série de enzimas que convertem o colesterol em estradiol. A expressão de estro, a liberação de GnRH e de LH e a expressão de características sexuais secundárias são algumas das funções do estradiol. Alguns exemplos de estrógenos que são utilizados em programas de reprodução em bovinos de corte e de leite são: estradiol-17β, cipionato de estradiol, benzoato de estradiol e valerato de estradiol. A diferença entre esses

tipos de estradiol é principalmente o peso molecular e a meia vida na circulação sanguínea (SOUZA et al., 2005). De acordo com esses autores, o estradiol-17 β apresenta maior pico e menor meia vida quando comparado ao cipionato de estradiol e o benzoato de estradiol apresenta valores intermediários para essas mesmas variáveis.

O estradiol pode estimular ou inibir a liberação de gonadotrofinas, dependendo da dose e das concentrações sanguíneas de P₄. Em doses fisiológicas e baixas concentrações de P₄, o estrógeno estimula a liberação de LH para que ocorra a ovulação. Ao contrário, elevadas doses de estrógenos, na presença de elevadas concentrações de P₄, bloqueiam as gonadotrofinas, inibindo principalmente a produção e liberação de LH. Além disso, o estrógeno é fundamental para a expressão de receptores para ocitocina no endométrio, o que é importante no processo de liberação de PGF_{2 α} para regressão do corpo lúteo (MORAES; SOUZA; GONÇALVES, 2002).

Protocolos de sincronização que utilizam implantes ou dispositivos contendo P₄ ou progestágenos associados ao tratamento com estradiol para sincronizar a emergência de nova onda folicular e posterior ovulação para a realização de IATF (BÓ et al., 1995) estão sendo muito utilizados em fazendas comerciais no Brasil (BARUSELLI; SALES; SÁ FILHO, 2010; RODRIGUES et al., 2010). A utilização de estrógenos nesses protocolos baseia-se no conhecimento de que, como mencionado acima, quando em presença de P₄, seja endógena (produzida pelo CL) ou exógena (liberada pelos dispositivos ou implantes contendo P₄), os estrógenos causam redução das concentrações sanguíneas de FSH e LH provocando atresia dos folículos dependentes (BARUSELLI; SALES; SÁ FILHO, 2010).

Apesar de os protocolos de sincronização de estro que utilizam estradiol e P₄/progestágeno ser efetivo em sincronizar as ovulações, estas são distribuídas em um intervalo de aproximadamente 48 horas, o que pode comprometer os

resultados de IATF. Por esse motivo, foram incorporados aos protocolos de IATF os indutores da ovulação. Os fármacos utilizados para induzir a ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH, por exemplo, os estrógenos em baixas doses e o GnRH, ou agem diretamente nos receptores de LH das células da granulosa dos folículos, por exemplo, a hCG e o LH (GREGORY et al., 2009).

O LH e a hCG têm sua ação iniciada logo após a absorção e fazem com que a ovulação ocorra em 24 a 26 horas após a aplicação (BARUSELLI; SALES; SÁ FILHO, 2010). Em relação ao GnRH, após sua aplicação o pico de LH ocorre em torno de 15 minutos. Já o benzoato de estradiol promove um pico de LH em um intervalo de 16 a 30 horas após sua aplicação (LAMMOGLIA et al., 1998). O pico de LH quando se aplica o cipionato de estradiol ocorre entre 45 e 49 horas após o tratamento (SALES et al., 2012). Dessa forma, o intervalo entre a retirada do dispositivo de P₄ e a ovulação é semelhante nos protocolos em que se usa o cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo de P₄ ou o benzoato de estradiol 24 horas após.

Segundo McDougall et al. (1992), protocolos com o uso do benzoato de estradiol após o tratamento com P₄ resultaram em maior número de vacas leiteiras que manifestaram estro, em comparação ao tratamento sem estradiol. Um estudo com 1.386 vacas leiteiras em anestro demonstrou que o tratamento com 2 mg de benzoato de estradiol, no início de um protocolo de oito dias com um implante de P₄, em comparação a um protocolo semelhante de seis dias com um implante de P₄ sem a injeção inicial de benzoato de estradiol, melhorou a taxa de prenhez em 7,8% (MCDUGALL, 2001). McDougall e Compton (2005) trabalhando com vacas leiteiras em anestro, tratadas com um implante de P₄ por oito dias, combinado com a aplicação de benzoato de estradiol no momento da inserção do implante e um dia após sua remoção, observaram maior

taxa de prenhez nas vacas tratadas comparadas às que não receberam tratamento hormonal (55 vs 35%).

Cerri et al. (2004) trabalhando com 799 vacas holandesas em lactação demonstraram aumento na taxa de prenhez, tanto nas vacas primíparas quanto nas múltiparas, quando usaram 1 mg de cipionato de estradiol como indutor de ovulação em um protocolo de IATF, comparado ao grupo controle, em que os animais foram inseminados após a detecção de cio induzido pela aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. No dia 58 após a IA, as taxas de prenhez foram 42,2% nas vacas múltiparas e 34,4% nas primíparas no tratamento com cipionato de estradiol, comparado com apenas 20,8 e 18,8% nas respectivas ordens de parto no grupo controle. Em outro estudo, a taxa de concepção foi melhor em vacas de leite, com produção média de 32 kg de leite/dia, que manifestaram estro antes da inseminação em protocolos em que a segunda dose de GnRH foi substituída por uma dose de cipionato de estradiol (GALVÃO et al., 2004).

Alguns dos benefícios da suplementação de estrógeno no final de protocolos de IATF foram relatados por Colazo et al. (2004), Hanlon et al. (1996) e Souza et al. (2007). O tratamento com estradiol melhorou a expressão de estro, melhorou a taxa de concepção em vacas que ovularam folículos de 15 a 19 mm e em novilhas primíparas com escore de condição corporal abaixo de 2,5. Assim, a suplementação com 1 mg de benzoato de estradiol ou cipionato de estradiol próximo do momento da inseminação artificial pode ser uma abordagem para melhorar a fertilidade em protocolos de IATF em vacas leiteiras.

2.5 Gonadotrofina coriônica equina (eCG)

A baixa concentração sanguínea de P_4 no diestro está relacionada com a queda nos índices reprodutivos de vacas. Uma das maneiras de tentar reverter

esse quadro seria aumentar a produção de P_4 pelo CL após a ovulação. O emprego da eCG nos protocolos de sincronização de estro, com o intuito de aumentar a taxa de ovulação e o tamanho do CL, tem sido bastante utilizado, principalmente em animais em anestro e com baixo escore de condição corporal (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003).

A eCG é um hormônio glicoproteico produzido pelas células trofoblásticas presentes nos cálices endometriais de éguas prenhas (ALLEN; MOOR, 1972). Possui duas subunidades chamadas de α e β e tem ação de LH e FSH na mesma molécula em equinos e em outras espécies (BOUSFIELD et al., 1996). A eCG parece ter efeito luteotrófico em equinos e outras espécies, sendo possível verificar aumento na concentração sanguínea de progesterona após o aumento natural ou por aplicação de eCG exógena (MURPHY; MARTINUK, 1991). A eCG possui meia-vida longa devido ao seu alto peso molecular, à presença de ácido siálico na molécula (MURPHY; MARTINUK, 1991) e ao fato de a molécula de eCG ser carregada negativamente, dificultando a filtração glomerular (LEGARDINIER et al., 2005). A grande meia-vida da eCG devido à presença do ácido siálico foi demonstrada por Martinuk et al. (1991), quando esses pesquisadores após retirarem cerca de 80% do ácido siálico da molécula de eCG, pela enzima neuraminidase, notaram que os níveis circulantes de eCG tornaram-se basais 1 hora após sua administração. Entretanto, no grupo controle, altas concentrações sanguíneas de eCG estavam presentes até 120 horas após o tratamento.

O uso de eCG em protocolos de sincronização de estros para IATF tem demonstrado aumentar a taxa de ovulação e de prenhez (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010a; SALES et al., 2011). O aumento na taxa de prenhez talvez esteja relacionado ao aumento da taxa de ovulação e da concentração plasmática de P_4 no diestro, minimizando falhas no reconhecimento materno (MANN; HARESIGN, 2001).

Marques et al. (2003) trabalharam com 52 vacas de corte $\frac{1}{2}$ sangue e observaram que os animais que receberam eCG no momento da retirada do implante de P₄, apresentaram maior concentração plasmática de P₄ no diestro, subsequente ao protocolo de sincronização da ovulação, em comparação ao grupo controle (8,6 e 4,5 ng/mL, respectivamente). A aplicação de 400 UI de eCG no momento da remoção do dispositivo de P₄ aumentou a taxa de prenhez (38,8 vs 51,9%) de vacas de corte lactantes em anestro pós-parto, em comparação às vacas que não receberam a eCG (BARUSELLI et al., 2004).

Sá Filho et al. (2010b) verificaram em vacas Nelore lactantes que o uso de 400 UI de eCG, no momento da retirada do implante de P₄, aumentou a taxa de crescimento folicular (1,5 vs 0,5 mm/dia), o diâmetro do folículo dominante (11,4 vs 9,3 mm), as taxas de ovulação (80,8% vs 50,0%) e de prenhez (51,7% vs 33,8%), em comparação às vacas que não receberam eCG. Em outro estudo, novilhas de corte que receberam 400 UI de eCG no momento da retirada do implante de P₄ apresentaram aumento no diâmetro do folículo dominante no momento da IATF (10,6 vs 9,5 mm), na taxa de crescimento do folículo dominante (1,14 vs 0,64 mm/dia), na taxa de ovulação (94,4% vs 73,6%), no diâmetro do CL (15,5 vs 13,8mm), na concentração de P₄ cinco dias após a IA (6,6 vs 3,6 ng/ml) e na taxa de prenhez (50,0% vs 36,8%), comparadas às que não receberam eCG (SÁ FILHO et al., 2010a). Sales et al. (2011) observaram que vacas de corte tratadas com 300 UI de eCG no momento da remoção do dispositivo de P₄ apresentaram maior taxa de crescimento folicular entre a retirada do dispositivo e a IATF quando comparadas às vacas que receberam FSH e às do grupo controle (1,40 vs 0,90 vs 0,95 mm). O tratamento com eCG resultou ainda em melhores taxas de ovulação (95,5 vs 56,4 vs 58,1%) e de concepção (71,6 vs 60 vs 61,5%) nas vacas com escore de condição corporal (ECC) <2,75.

Em vacas leiteiras poucos estudos foram realizados com o intuito de avaliar o uso de eCG em protocolos de IATF, porém, os resultados relatados na literatura mostram-se promissores. Souza, Viechnieski e Lima (2009) avaliaram os efeitos de 400 UI de eCG e o tipo de estímulo ovulatório (GnRH ou cipionato de estradiol) em protocolo de IATF em vacas cíclicas. Os autores observaram aumento na taxa de concepção no grupo tratado com eCG + GnRH, em comparação ao grupo sem o uso da eCG (33,8 vs 28,9%). O tratamento com eCG tendeu a aumentar a concentração sérica de P₄ durante o diestro. Porém, o uso de GnRH ou de cipionato de estradiol para indução da ovulação não influenciou o volume do CL ou a concentração sérica de P₄. Além disso, vacas com ECC abaixo de 2,75 que não receberam eCG tiveram menor taxa de concepção (15,2%) comparadas às que receberam eCG (38%).

Em estudo com 72 vacas holandesas em anestro pós-parto, Martínez e Sierra (2010) verificaram aumento na manifestação de estro (88,63 vs 67,86%), na taxa de prenhez ao primeiro serviço (51,28 vs 36,84%) e na taxa de concepção (48,31 vs 34,48%) nas vacas que receberam 400 UI de eCG juntamente com a retirada do implante de P₄ no oitavo dia do protocolo, em comparação às vacas que não receberam a eCG.

Por outro lado, Ferreira et al. (2013), utilizando um protocolo à base de estradiol e P₄, sem administração de eCG ou com administração de 400 UI ou 600 UI de eCG no oitavo dia do protocolo, em vacas holandesas com produção média de leite de 30,5 kg/dia, não encontraram diferença no diâmetro do folículo dominante (13,2 vs 14,2 vs 13,2 mm), na taxa de crescimento do folículo dominante (2,5 vs 3,9 vs 3,5 mm), na taxa de ovulação (86,7 vs 92,9 vs 90,9%), na taxa de concepção (26,6 vs 24,4 vs 31,7%) e na concentração de progesterona após a IA. Dessa forma, o uso de 400 ou 600 UI de eCG foi ineficiente em alterar a dinâmica folicular e luteal em vacas holandesas de alta produção.

2.6 Suplementação com progesterona

Outra maneira de aumentar a concentração de P_4 no diestro é a suplementação direta de P_4 após a IA. O estabelecimento e a manutenção da gestação, bem como o crescimento embrionário em vacas estão diretamente relacionados à capacidade de secreção de P_4 pelo CL. A deficiência na produção desse hormônio pode levar a perdas embrionárias (THATCHER et al., 1994). Segundo Diskin et al. (2008), a baixa concentração sanguínea de P_4 tem sido fator causador de baixa taxa de prenhez em vacas leiteiras de alta produção.

A P_4 é um componente-chave na complexa regulação do funcionamento do sistema genital feminino. De modo geral, os locais de ação mais importantes da P_4 nos mamíferos ocorrem no útero e nos ovários, na glândula mamária e no sistema nervoso central, no qual modula sinais requeridos para o comportamento de receptividade sexual e secreção de GnRH (ROBINSON, 1995).

O ovário é o principal local de síntese e secreção de estrógenos e P_4 em mamíferos, promovendo flutuações cíclicas nas concentrações desses hormônios na circulação. A P_4 é o principal hormônio produzido pelo CL (GRAHAM; CLARKE, 1997). Na ausência de fertilização dentro de um a dois dias, o CL continuará a crescer por mais duas semanas, seguido da regressão da glândula, com concomitante queda da produção de P_4 . Se a fertilização ocorrer, o CL continua a crescer e a exercer seus papéis fisiológicos (STOUFFER, 2006).

Durante os estágios iniciais da gestação, a P_4 melhora o desenvolvimento do embrião, a produção de *interferon-tau* e regula o desenvolvimento do mecanismo luteolítico (GEISERT et al., 1992). No início da gestação, o embrião deve inibir o desenvolvimento do mecanismo luteolítico por meio da secreção de uma proteína, *interferon-tau*, para manter a secreção de P_4 pelo CL e possibilitar o seu desenvolvimento (ROBINSON et al., 1999). O *interferon-tau* começa a ser produzido pelas células trofoblásticas embrionárias

a partir do dia 12 de gestação em bovinos e atinge o pico por volta dos dias 15-17 (FARIN et al., 1990), quando ocorre o reconhecimento materno da gestação. O efeito antiluteolítico do *interferon-tau* resulta da inibição da expressão dos receptores de ocitocina nas células endometriais, que conseqüentemente inibe a secreção de PGF_{2α} (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001). Segundo Thatcher, Meyer e Danet-Desnoyers (1995), o fator mais importante no reconhecimento e manutenção da gestação em vacas é o *interferon-tau*.

Provavelmente, a concentração de P₄ por volta do momento do reconhecimento materno, exerce importante papel no estabelecimento da prenhez (KENYON et al., 2013). Em animais cobertos que subsequentemente sofrem luteólise, as concentrações de P₄ tanto no plasma quanto no leite são menores durante a segunda metade da fase luteal (10 a 17 dias após a IA) do que em vacas que se tornam gestantes (LAMMING; DARWASH; BACH, 1989). Esses achados sugerem que a concentração plasmática de P₄ pode ser fator vital na determinação do sucesso ou falha da gestação. Entretanto, permanece por ser determinado se essa diferença na concentração sanguínea de P₄ é resultado de fatores que levam à falha da gestação ou se é a causa da perda embrionária precoce (MANN; LAMMING, 1995).

Um trabalho com novilhas holandesas receptoras avaliou a relação da taxa de prenhez com a concentração de P₄ no dia da transferência de embriões. A taxa de prenhez foi de 20% nas novilhas com concentração sérica de P₄ menor do que 2,0 ng/mL, de 72% nas novilhas com P₄ entre 2,0 e 5,0 ng/mL e de 60% nas com P₄ acima de 5,0 ng/mL (REMSSEN; ROUSSEL, 1982). No entanto, Farin e Farin (1995) trabalhando com embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e transferidos para novilhas receptoras, observaram que as novilhas que tiveram perda da prenhez até o sétimo mês de gestação apresentaram concentração média de P₄ de 5,8 ng/mL no dia da transferência, enquanto as novilhas que mantiveram a prenhez apresentaram concentração média de P₄ de 4,0 ng/mL.

Mann e Lamming (2001) verificaram que o grupo de vacas holandesas, que apresentou menor desenvolvimento embrionário 16 dias após IA, teve baixa concentração de P₄ após a ovulação (1,0 ng/mL), e concentração de *interferon-tau* indetectável, comparadas às vacas que tiveram um bom desenvolvimento embrionário. Em um estudo em que foram coletadas amostras de sangue de vacas de leite na quinta semana após IA, 50% das vacas com concentração de P₄ ≤ 2,8 ng/mL abortaram antes da nona semana de gestação e 95% das vacas que mantiveram a gestação apresentaram concentração de P₄ de 6 ng/mL (STARBUCK; DAILEY; INSKEEP, 2004).

Kenyon et al. (2013) trabalhando com vacas holandesas em lactação demonstraram que, nas vacas prenhas no dia 63 após IA, a concentração mínima de P₄ entre os dias zero e sete e entre os dias sete e 14 após a IA foi de 2,71 ng/mL e 1,48 ng/mL, respectivamente. Nesse mesmo trabalho, vacas com concentração de P₄ abaixo de 5,0 ng/mL no dia 14 após a IA tiveram maiores perdas embrionárias entre os dias 28 e 42 após IA.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de tentar aumentar a taxa de gestação em bovinos por meio da administração de P₄. Alguns estudos não obtiveram resultados satisfatórios (BULMAN et al., 1978; MACMILLAN; PETERSON, 1993; STEVENSON et al., 2007), ao passo que outros conseguiram elevar significativamente a taxa de gestação (JOHNSON, 1958; ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989).

Em vacas de corte, Garrett et al. (1988) demonstraram que o tratamento com 100 mg de P₄ injetável nos dias um a quatro após a IA resultou em aumento na concentração sérica de P₄ nos dias dois a cinco após a IA (3,40 ng/mL), comparado às vacas-controle (1,22 ng/mL). Além disso, o tratamento com P₄ aumentou o comprimento do concepto (37,3 vs 3,8mm). O comprimento do concepto variou de 1 a 13 mm no grupo controle comparado com 3 a 119 mm no grupo tratado com P₄. A produção de *interferon-tau* no dia 14 após a IA foi

maior no grupo tratado (15,2 vs 8,26 mg). Carter et al. (2008) usaram um implante contendo 1,55g de P₄ no 3º dia após a IA em novilhas de corte e observaram aumento na concentração sanguínea de P₄ até o 8º dia após a IA. A elevação na concentração de P₄ foi associada ao aumento no comprimento do embrião no grupo tratado nos dias 13 (2,24 vs 1,15 mm) e dia 16 (14,06 vs 5,97 cm) após a IA em comparação ao grupo não tratado. Clemente et al. (2009) transferiram embriões de sete dias produzidos *in vitro* para novilhas de corte receptoras tratadas (n=9) ou não tratadas (n=9) com implante contendo 1,55 g de P₄ no 3º dia após o estro. A elevação na concentração de P₄ antes da transferência do embrião no dia sete resultou em aumento significativo no comprimento do embrião no dia 14 nas receptoras tratadas, comparadas às receptoras não tratadas (15,4 vs 4,27 mm).

Johnson (1958 citado por LONERGAN, 2011), verificou aumento na taxa de prenhez em vacas que receberam 100 mg de P₄ injetável nos dias dois, três, quatro, seis e nove após a IA, comparadas às do grupo controle (68 vs 42%). Robinson, Leslie e Walton (1989), trabalhando com vacas holandesas, relataram maior taxa de prenhez aos 55 dias após IA nas tratadas com implante contendo 1,55 g de P₄ entre os dias cinco e 12 após a IA (60,7%) ou entre os dias 10 e 17 (59,2%), comparadas às do grupo controle (30%).

Stevenson et al. (2007) trabalharam com 2.852 vacas leiteiras de cinco rebanhos e verificaram os efeitos de vários tratamentos após a IA na fertilidade, incluindo o uso de GnRH, hCG ou implante contendo 1,38g de P₄. O tratamento com implante de P₄ tendeu a aumentar a taxa de concepção somente em dois rebanhos (50,1 vs 31,7%; rebanho 1 e 40,3 vs 26,9%; rebanho 3) e diminuiu em um rebanho (23,4 vs 33,8%; rebanho 4). Em outro estudo, 398 vacas holandesas em lactação foram sincronizadas com o protocolo Ovsynch convencional ou com um protocolo Ovsynch modificado (segundo GnRH aplicado 60h após a PGF2 α), sem ou com suplementação de P₄ a partir do 4º dia após a IA por 14

dias (Forro et al., 2012). A suplementação de P₄ foi feita por meio de implante intravaginal. Os autores observaram uma tendência de aumento na taxa de concepção nos animais que receberam suplementação de P₄, comparadas às do grupo que não receberam P₄, independente do protocolo usado (44,8 vs 38,1%). Ainda neste trabalho, os animais que receberam suplementação com P₄ apresentaram valores mais altos de P₄ na circulação nos dias cinco (4,9 vs 2,6 ng/mL) e 18 (7,8 vs 6,3 ng/mL), após a IA comparados aos do grupo não tratado.

2.7 Hipóteses

Baseado nos trabalhos em que eCG e progesterona exógena foram utilizados em bovinos de leite e de corte, as hipóteses são que a suplementação de eCG e de P₄ aumentarão a concentração sanguínea de P₄ e a taxa de prenhez e reduzirão a perda embrionária em vacas holandesas submetidas ao protocolo de IATF à base de estradiol e P₄.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A elevada concentração sanguínea de P_4 após a IA é o ponto chave na melhoria do estabelecimento e manutenção da prenhez. Porém, as estratégias para aumentar a concentração sanguínea de P_4 após a inseminação artificial têm levado a resultados variáveis em termos de aumento da taxa de prenhez. Essa variação pode ser devido à categoria de animal tratado (novilhas, vacas de leite e vacas de corte lactantes e não lactantes), à condição corporal, à ciclicidade e às concentrações endógenas de P_4 no momento do início do protocolo de IATF. Com isso, mais trabalhos nessa área são necessários a fim de identificar combinações entre tratamentos e as categorias de animais tratados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, p. 177–188, 1992.

ADAMS, G. P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 72-80, 2008.

AL- KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactation Holstein cows in hot climate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 2611–2616, 1999.

ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 29, p. 313-316, 1972.

ARMSTRONG, D. G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, p. 1624-1632, 2001.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F. Atualização dos protocolos de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4., 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: [s. n.], 2010. p. 166-185.

BEAM, S. W., BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 56, p. 133–142, 1997.

BILBY, T. R. Melhoria da fertilidade de vacas repeat breeder. In. CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 1., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2009. p. 120.

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

BÓ, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 39, p. 193-204, 1995.

BOUSFIELD, G. R. et al. Structural features of mammalian gonadotropins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, London, v. 125, p. 3-19, 1996.

BRITT, J. H. Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 17., 1991, St. Paul. **Proceedings...** St. Paul: WCB, 1991. p. 143–149.

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

BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 211-218, 2003.

CARTER F. et al. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 20, p. 368–375, 2008.

CERRI, R. L. A. et al. Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 3704–3515, 2004.

CLEMENTE, M. et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, Cambridge, v. 138, p. 507–17, 2009.

COLAZO, M. G. et al. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, p. 25–34, 2004.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 41–49, 2001.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 260–267, 2008. (Suppl. 2).

DRANSFIELD, M. G. B. et al. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 1874–1882, 1998.

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

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of Bovine Embryos Produced In Vivo or In Vitro: Survival and Fetal Development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 676–682, 1995.

FERREIRA, R. M. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 13, p. 378-4320, may 2013.

FORRO, A. et al. Combined use of Ovsynch and progesterone supplementation after artificial insemination in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 4372-4381, 2012.

GALVAO, K. N. et al. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3508-3517, 2004.

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

GEISERT, R. D. et al. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 4, p. 301-305, 1992.

GINTHER, O.J., BEG, M.A., DONADEU, F.X., BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 239-257, 2003.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological actions of progesterone in target tissues. **Endocrinology Reviews**, Stanford, v. 18, p. 502-518, 1997.

GREGORY, R. M. et al. Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 148-152, dez. 2009. (Supl.).

HANLON, D. W. et al. The effect of estradiol benzoate administration on estrus response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, p. 775–785, 1996.

HAWK, H. W. et al. Embryonic mortality between 16 and 34 days post-breeding. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 38, p. 673-676, 1955.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 1417–1433, 2001.

JOHNSON, K. R. Effect of 17 alpha-hydroxyprogesterone 17-ncaproate on the reproductive performance of cattle. **Annals the New York Academy of Sciences**, New York, v. 71, p. 577–579, 1958.

KASTELIC, J. P. Basic knowledge of folliculogenesis and its application in assisted reproduction techniques. Biotecnologia da reprodução em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 5., 2012, Londrina. **Anais...** Londrina: [s. n.], 2012. p. 7-17.

KENYON, A. G. et al. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 136, n. 4, p. 223-230, Jan. 2013.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BACH, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 37, p. 245-252, 1989. (Suppl.).

LAMMOGLIA, M. A. et al. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 1662-1670, 1998.

LEGARDINIER, S. et al. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 45, p. 255-259, 2005.

LEROY, J. L. M. R. et al. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 2022–2036, 2005.

LEROY, J. L. M. R. Priorização de nutrientes em vacas leiteiras no pós parto imediato: discrepância entre metabolismo e fertilidade. In. CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 13., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2009. p. 3.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, p. 1594-1601, 2011.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, p. 209-223, 2004.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 1277–1293, 2001.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, p. 1–25, 1993.

MANN, G. E.; HARESIGN, W. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF_{2α} release and luteal life span in anoestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 245-252, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 104, p. 1-5, 1995.

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

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

MARQUES, M. O. et al. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Proceedings...** Córdoba: [s. n.], 2003. p. 392.

MARTÍNEZ, C.; SIERRA, I. **Efecto de la aplicación de eCG al momento del retiro del implante intravaginal DIV-B® sobre los porcentajes de inducción de celo y preñez en vacas lecheras con anestro pos parto.** 2010. 17 p. Proyecto especial (Graduación del programa de Ingeniería Agronómica) - Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 2010.

MARTINUK, S. D. et al. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. **Biology Reproduction**, Champaign, v. 45, p. 598-604, 1991.

MCDUGALL, S. et al. The effect of pretreatment with progesterone on the oestrous response to oestradiol-17 β benzoate in the post-partum dairy cow. **New Zealand Society of Animal Production**, Hamilton, v. 52, p. 157-160, 1992.

MC DOUGALL, S. Reproductive performance of anovulatory anoestrus postpartum dairy cows following treatment with two progesterone and oestradiol benzoate-based protocols, with or without resynchrony. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 49, p. 187-194, 2001.

MCNEILL, R. E. et al. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1435–1441, 2006.

MONTEIRO JÚNIOR, P. L. J. et al. Evaluation of timed artificial insemination protocols in dairy cattle: presynchronization with GnRH, increasing estradiol benzoate, and limitations to success during the protocol. **Animal Reproduction**, Campinas, v. 9, p. 541, 2012.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. B **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 25-55.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 12, p. 27-43, 1991.

PANCARCI, S. M. et al. Use of estradiol cypionate in a pre-synchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 122-131, 2002.

PEREIRA, M. H. C. et al. Effect of proestrus length on fertility in dairy cows submitted to ovulation synchronization. **Animal Reproduction**, Campinas, v. 9, p. 517, 2012.

PURSLEY, R. J.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, p. 915–923, 1995.

REMSEN, L. G.; ROUSSEL, J. D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 18, p. 365-372, 1982.

RHODES, F. M. et al. Invited review: treatment of cows with extended postpartum anestrus interval. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 1876–1894, 2003.

ROBINSON, J. E. Gamma amino-butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 221-230, 1995. (Suppl.).

ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 202-207, 1989.

ROBINSON, R. S. et al. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 160, p. 21–33, 1999.

ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, p. 282-296, 2006.

RODRIGUES, C. A. et al. Aplicação prática das técnicas de reprodução em vacas de leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4., 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: [s. n.], 2010. p. 143-156.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows, **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p. 651–658, 2010b.

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

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p. 510-516, 2012.

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-anestrus Nelore beef cows, **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 12–18, 2011.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17b in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2831–2842, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 513–535, 2004.

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

SARTORI, R. et al. Particularidades da reprodução de vacas de leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 5., 2012, Londrina. **Anais...** Londrina: [s. n.], 2012. p. 33-48.

SATTERFIELD, M. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 75, p. 289–296, 2006.

SNIJDERS, S. E. M. et al. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p. 981–989, 2000.

SOUZA, A. H. et al. Profiles of circulating estradiol after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 4, p. 224–232, 2005.

SOUZA, A. H. et al. Supplementation with estradiol-17 β before the last GnRH of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 4623–4634, 2007.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 10–21, 2009.

STARBUCK, M. J.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, p. 27–39, 2004.

STEVENSON, J. S. et al. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 2567–2578, 2006.

STEVENSON, J. S. et al. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 331–340, 2007.

STOUFFER, R. L. Structure, function, and regulation of the corpus luteum. In: NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and neill's physiology of reproduction**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.

STRONGE, A. J. et al. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 1212–1224, 2005.

TANABE, T. Y.; CASIDA, L. E. The nature of reproductive failure in cows of low fertility. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 32, p. 237-246, 1949.

THATCHER, W. W. et al. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 16-30, 1994. (Suppl. 3).

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 15-28, 1995. (Suppl.).

VAN CLEEFF, J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous response of dairy heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 36, p. 795–807, 1991.

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

VILLA-GODOY, A. et al. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 1063-1072, 1988.

WASHBURN, S. P. et al. Trends in Reproductive Performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI Herds. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 244-251, 2002.

WILTBANK, M. C. et al. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 32, 2001. (Suppl. 1).

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 25-55, 2000.

ARTIGO

Estratégias para aumentar a concentração sérica de progesterona no início do desenvolvimento embrionário de vacas holandesas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo

RESUMO

A concentração sérica de progesterona e as taxas de prenhez e de perda embrionária foram avaliadas em vacas leiteiras submetidas ao protocolo de inseminação artificial (IA), em tempo fixo à base de estradiol e progesterona (P_4) e tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG) e/ou P_4 injetável. O protocolo de sincronização consistiu no uso de um implante de P_4 por oito dias, administração de benzoato de estradiol no dia de início do protocolo (D0), de $PGF_{2\alpha}$ no D7 e de cipionato de estradiol no D8. A IA foi realizada em tempo fixo no D10. No D8 do protocolo as vacas foram alocadas aleatoriamente a um de quatro tratamentos em delineamento fatorial 2x2: Grupo controle – sem eCG e sem P_4 (n=104); Grupo eCG – 400 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona (n=93); Grupo P_4 – 600 mg de P_4 no terceiro dia após a IA (n=106); Grupo eCG + P_4 – 400 UI de eCG e 600 mg de P_4 (n=95). A concentração sérica de P_4 foi quantificada nos dias três, quatro e 13 após a IA. As vacas foram examinadas por ultrassonografia 32 dias após a IA para diagnóstico de gestação e aos 46 dias para avaliação de perda embrionária. A interação entre eCG e P_4 injetável não foi significativa ($P>0,05$) na análise de qualquer das variáveis. A administração de eCG não resultou em aumento da concentração sérica de P_4 e da taxa de prenhez e não reduziu a perda embrionária ($P>0,05$). O uso de P_4 injetável três dias após a IA aumentou ($P<0,01$) a concentração sérica de P_4 24 horas após a administração em comparação às vacas não tratadas ($3,43\pm 0,23$ vs $1,22\pm 0,50$ ng/mL), mas esse efeito não foi observado no dia 13 após a IA ($P>0,05$). O tratamento com P_4 injetável não influenciou as taxas de prenhez e de perda embrionária ($P>0,05$). Em conclusão, a adição de 400 UI e/ou 600 mg de P_4 no protocolo de IATF foi ineficiente em aumentar a taxa de prenhez ou diminuir a perda embrionária.

Palavras-chave: Eficiência reprodutiva. Taxa de prenhez. Suplementação de progesterona. Corpo lúteo.

ABSTRACT

Serum concentrations of progesterone and pregnancy rates and embryonic loss were evaluated in dairy cows submitted to the protocol for artificial insemination (AI) fixed-time base to estradiol and progesterone (P₄) and treated with equine chorionic gonadotropin (eCG) and/or P₄ injection. The synchronization protocol consisted in an implant use P₄ per eight days, administration of estradiol benzoate on the initiation day of the protocol (D0), of PGF_{2α} on D7 and estradiol cypionate on D8. The AI was performed at fixed time on D10. On D8 of the protocol cows were randomly allocated to one of four treatments in a 2x2 factorial: Control group - without eCG and without P₄ (n= 104); Group eCG - 400 IU of eCG at progesterone device removal (n= 93); Group P₄ - 600 mg of P₄ on the third day after AI (n= 106); Group eCG + P₄ - 400 IU of eCG and 600 mg of P₄ (n= 95). The serum concentration of P₄ was quantified on the days three, four and 13 after AI. Cows were examined by ultrasonography 32 days after AI to pregnancy diagnosis and on day 46 for evaluation of embryonic loss. The interaction between eCG and P₄ injection was not significant (P>0.05) in the analysis of any variables. The administration of eCG did not result in increased serum concentrations of P₄ and pregnancy rate, and did not reduce embryonic loss (P>0.05). The use of P₄ injection three days after AI increased (P>0.01) the serum concentration of P₄ 24 hours after administration compared to untreated cows (3.43±0.23 vs 1.22±0.50 ng/mL), but this effect was not observed on day 13 after AI (P>0.05). The treatment with P₄ injection did not influenced pregnancy rate and embryonic loss (P>0.05). In conclusion, the addition of 400 IU and/or 600 mg of P₄ in the protocol IATF were ineffective in increasing the pregnancy rate and decrease embryo loss.

Keywords: Reproductive efficiency. Pregnancy rate. Progesterone supplementation. *Corpus luteum*.

1 INTRODUÇÃO

A baixa fertilidade das vacas leiteiras de alta produção pode ser considerada de natureza multifatorial (CHEBEL et al., 2004). Dentre os vários aspectos envolvidos, destaca-se a baixa concentração sanguínea de progesterona (P_4) nos primeiros seis dias após a inseminação artificial (IA) (LONERGAN, 2011). Algumas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a concentração de P_4 após a IA, incluindo as que aumentam a função endógena do corpo lúteo (CL) existente (PULLEY et al., 2013), as que induzem a formação de um CL acessório (STEVENSON et al., 2007) e as que aumentam a concentração sanguínea de P_4 por meio da suplementação direta desse hormônio (FORRO et al., 2012).

Nos últimos anos, o uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) tem sido avaliado como forma de melhorar a fertilidade de vacas e novilhas de leite (SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009) e de corte (SÁ FILHO et al., 2010a, 2010b; SALES et al., 2011). A eCG tem atividade semelhante ao FSH e ao LH, estimulando o desenvolvimento folicular, o que resulta em maior tamanho e capacidade esteroidogênica do CL, com consequente aumento na concentração sanguínea de P_4 (PULLEY et al., 2013). Quando administrada no momento da retirada do implante de P_4 em um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a eCG aumentou (MARQUES et al., 2003; SÁ FILHO et al., 2010a) ou tendeu a aumentar (SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009) a concentração sérica de P_4 após a IA e aumentou a taxa de prenhez (MARTINEZ; SIERRA, 2010; SÁ FILHO et al., 2010a, 2010b; SALES et al., 2011; SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009). Porém, outros autores não observaram melhora da fertilidade de vacas holandesas tratadas com eCG (FERREIRA et al., 2013).

A suplementação direta de P_4 após a IA também tem sido avaliada como estratégia para aumentar a taxa de concepção e diminuir a perda embrionária

precoce. A administração de P₄ exógena por meio da utilização de implante intravaginal de P₄ durante a fase lútea após a IA resultou em aumento da concentração sanguínea de P₄ (MACMILLAN; PETERSON, 1993; ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989), contudo, resultados inconsistentes foram observados quanto à taxa de concepção (FORRO et al., 2012; MACMILLAN; PETERSON, 1993; ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989; STEVENSON et al., 2007). Por outro lado, vacas que receberam suplementação de P₄ injetável após a cobertura tiveram aumento no comprimento do embrião (GARRETT et al., 1988) e na taxa de prenhez (JOHNSON, 1958 citado por LONERGAN, 2011). Uma meta-análise de 17 estudos com suplementação de P₄ após a IA indicou que o tratamento durante a primeira semana, após a IA aumentou a taxa de concepção, porém esse efeito não foi observado quando o tratamento foi realizado na segunda ou terceira semana após IA (MANN; LAMMING, 1999).

A associação da eCG e a P₄ injetável podem apresentar efeitos aditivos que aumentam a concentração sanguínea de P₄ após IA e a taxa de prenhez. A utilização de uma alta e única dose de P₄ injetável (600 mg) merece ser avaliada, já que esse tratamento pode diminuir o manejo reprodutivo nas fazendas, comparativamente ao uso de doses menores (100 mg) por vários dias (GARRETT et al., 1988). Diante disso, a hipótese do presente estudo foi que o aumento da concentração sanguínea de P₄ em vacas leiteiras pode melhorar a taxa de prenhez e diminuir a perda embrionária. Os objetivos foram avaliar os efeitos da suplementação de eCG e P₄ injetável, isoladamente ou em conjunto, sobre a concentração sérica de P₄, as taxas de prenhez e perda embrionária de vacas leiteiras submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação à base de estradiol e progesterona.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e manejo

O experimento foi realizado entre março e julho de 2013 em dois rebanhos leiteiros comerciais mantidos em sistema Free-stall, localizados no sudeste do Brasil. Foram utilizadas 329 vacas holandesas, nas quais foram realizados 398 protocolos, sendo 237 em primíparas e 161 em multíparas. No dia de início do protocolo as vacas apresentaram em média (\pm EPM) 27,7 \pm 0,35 kg de leite/dia, 137 \pm 4,66 dias em lactação, 3,0 \pm 0,02 unidades de escore de condição corporal (ECC) e 3,0 \pm 0,11 IA. Do total de protocolos realizados, 166 foram em vacas que receberam pelo menos uma injeção de rBST antes do início do protocolo, e 255 em vacas que apresentaram pelo menos um CL no primeiro dia do protocolo de sincronização de estro.

Em ambas as fazendas as vacas foram submetidas a três ordenhas diárias e alimentadas com ração total à base de silagem de milho, milho, polpa cítrica, farelo de soja e núcleo mineral e vitamínico, formulada para atender ou exceder as exigências nutricionais de vacas leiteiras lactantes. Dentro de cada fazenda as vacas foram manejadas como um grupo único e não houve diferença no manejo nutricional ou em qualquer outra prática de manejo. Os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animais CEUA da Universidade Federal de Lavras – UFLA (protocolo 037/12).

2.2 Mensuração da produção de leite e avaliação da condição corporal

A produção de leite mais próxima do início do protocolo de sincronização de estro em cada vaca foi utilizada para avaliar a influência da produção na resposta aos tratamentos. O número de dias da pesagem de leite em relação ao início do protocolo foi em média (\pm EPM) de 7,1 \pm 0,2 dias.

O ECC foi avaliado por três avaliadores independentes, por observação visual em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de emaciada e 5 representativo de gorda (WILDMAN et al., 1982), no dia do início do protocolo hormonal. Foi considerada a média do ECC dos três avaliadores.

2.3 Delineamento experimental

As vacas com dias em lactação (DEL) ≥ 35 , que não estavam gestantes da última inseminação, sem patologias reprodutivas (infecção uterina, cistos foliculares, e aderências nos ovários e/ou no útero), com ECC $\geq 2,25$ e sem problemas de locomoção foram submetidas a um protocolo de sincronização da emergência folicular e ovulação para IATF (Figura 1). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), todos os animais receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), via i.m. e um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P₄ (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil). No dia 7 (D7), as vacas receberam 0,530 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil), via i.m. No dia 8 (D8), o dispositivo intravaginal foi removido e administrou-se i.m. 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Nesse momento as vacas foram alocadas aleatoriamente dentro de cada fazenda a um de quatro tratamentos, em um delineamento fatorial 2x2:

Grupo controle - aplicação de solução salina (i.m.) no momento da retirada do dispositivo de progesterona e no 3^o dia após a IA (n=104).

Grupo eCG - aplicação de 400 UI (i.m.) de eCG (SincroeCG, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) no momento da retirada do dispositivo de progesterona e de solução salina (i.m.) no 3^o dia após a IA (n=93).

Grupo P₄ - aplicação de solução salina (i.m.) no momento da retirada do dispositivo de progesterona e de 600 mg (i.m.) de progesterona injetável

(Sincrogest injetável Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) no 3º dia após a IA (n=106).

Grupo eCG + P₄ - aplicação de 400 UI (i.m) de eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona e aplicação de 600 mg (i.m) de progesterona injetável no 3º dia após a IA (n=95).

A inseminação artificial (IA) foi realizada 48h após a retirada do dispositivo de progesterona.

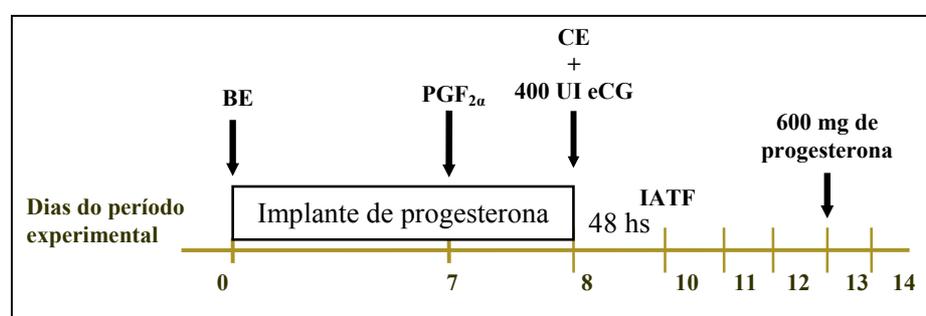


Figura 1 Diagrama do protocolo de sincronização do estro e ovulação, aplicação de eCG e progesterona. BE= Benzoato de estradiol (2mg); PGF_{2α}= prostaglandina 2α; CE= cipionato de estradiol; eCG= gonadotrofina coriônica equina

2.4 Coleta de sangue e análise de progesterona

Amostras de sangue foram coletadas de um subgrupo de vacas para quantificação de progesterona sérica, imediatamente antes da aplicação da progesterona injetável (n=15/tratamento), às 24 horas após a aplicação da progesterona injetável (n=15/tratamento) e no dia 13 após IA (Controle e eCG: n=39, P₄ e eCG+P₄: n=38). As amostras foram obtidas por punção dos vasos coccígeos em tubos de vidro de coleta a vácuo sem anticoagulante (Vacutainer, Shandong Weigao Group Medical Polymer Co., Ltd). Após a coleta, as amostras foram imediatamente armazenadas em geladeira e centrifugadas (1.509 x g por 20 minutos) para obtenção do soro, que posteriormente foi congelado a -20 °C até o momento da análise hormonal para progesterona. O ensaio de progesterona

foi realizado pela técnica de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida, utilizando *kit* comercial (Cout-a-Count® Siemens, Los Angeles, CA, USA). O coeficiente de variação intraensaio alto foi 4,46% e o baixo 0,39%, respectivamente. Em 30 amostras coletadas antes da aplicação de progesterona injetável (Controle: n=6, eCG: n=8, P₄: n=9, eCG+P₄: n=7) houve contaminação e os dados dessas amostras não foram incluídos nas análises estatísticas

2.5 Diagnóstico de gestação

As vacas foram examinadas por ultrassonografia com transdutor linear de 5,0 MHz (Chison 600 VET, Chison Medical Imaging Co., Ltd., China) no dia 32 após a IA para diagnóstico de gestação. As vacas com diagnóstico de prenhez positivo aos 32 dias foram submetidas a novo exame aos 46 dias para avaliação de perda embrionária. A taxa de prenhez aos 32 e aos 46 dias em cada tratamento foi calculada como o número de vacas diagnosticadas gestantes em relação ao número de vacas inseminadas. A taxa de perda embrionária foi calculada como o número de vacas não gestantes aos 46 dias em relação aos 32 dias.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sistema de Análise Estatística para Windows (SAS INSTITUTE, 2001). Os dados contínuos (concentração sérica de P₄) foram testados quanto à normalidade dos resíduos e analisados por meio do procedimento UNIVARIATE (transformados quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. O procedimento GLM com ajuste do teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos. O modelo estatístico utilizado incluiu efeitos de eCG, P₄, tempo e interações. Nas análises estatísticas

dos dados binomiais, as variáveis incluídas inicialmente nos modelos foram eCG (com eCG e sem eCG), P₄ (com P₄ e sem P₄), fazenda, ordem de parto, ECC, dias em leite, produção de leite, *repeat breeder* (vacas com mais de três IA), uso de rbST e presença de CL no primeiro dia do protocolo de sincronização, mês da IATF e suas interações. Os dados foram analisados por regressão logística multivariada, utilizando o procedimento LOGISTIC do SAS. As variáveis foram removidas por eliminação *backward*, com base no critério estatístico de Wald quando $P < 0,20$. Variáveis incluídas no modelo final para análise da taxa de prenhez aos 32 dias foram eCG, P₄, mês da IATF e interações. Odds ratio ajustada (AOR) e intervalo de confiança de 95% (IC) foram gerados durante a regressão logística. Os resultados são apresentados como proporções e AOR. Variáveis incluídas no modelo final para análise da taxa de prenhez aos 46 dias foram eCG, P₄, mês da IATF, ECC, *repeat breeder* e interações. Variáveis incluídas no modelo final para análise de perda embrionária foram eCG, P₄, CL no primeiro dia do protocolo de sincronização, *repeat breeder* e interações. As taxas de prenhez e de perda embrionária foram analisadas usando o procedimento GLIMMIX do SAS. Diferenças significativas foram indicadas por uma probabilidade de $P < 0,05$. Os dados contínuos são apresentados como média \pm EPM e dados binomiais são apresentados como porcentagem.

3 RESULTADOS

Não houve interação entre os tratamentos com eCG, P₄ injetável e o momento da coleta de sangue (P=0,49), entre o tratamento com eCG e o momento da colheita de sangue (P=0,84) e entre os tratamentos com eCG e P₄ injetável (P=0,94) na concentração sérica de P₄. Além disso, não se verificou efeito do tratamento com eCG (P=0,17) na concentração sérica de P₄ nos diferentes dias avaliados. No entanto, as vacas tratadas com P₄ injetável no terceiro dia após a IA apresentaram maior concentração sérica de P₄ (Interação tratamento com P₄ injetável e momento da coleta de sangue; P<0,01) 24 horas após o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração sérica de progesterona (média±erro-padrão) nos dias três, quatro e 13 após IA

	Momento da colheita de sangue após a IATF			P
	3º dia após IA	4º dia após IA	13º dia após IA	
Gonadotrofina				
Sem eCG	0,54±0,07 (15)	2,22±0,29 (30)	4,24±0,23 (71)	0,17
Com eCG	0,90±0,15 (15)	2,43±0,26 (30)	4,81±0,24 (76)	
Progesterona				
Sem P ₄	0,68±0,12 (16)	1,22±0,15 ^b (30)	4,36±0,23 (75)	0,01*
Com P ₄	0,77±0,14 (14)	3,43±0,23 ^a (30)	4,69±0,25 (75)	

^{a, b} Dentro de tratamento, médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si. *Interação entre P₄ injetável e momento da colheita de sangue.

Não houve interação entre os tratamentos (eCG e P₄) e a variável explanatória (Mês da IATF; P>0,05) na taxa de prenhez aos 32 dias de gestação. Além disso, não houve interação entre os tratamentos com eCG e P₄ injetável (P=0,11; Tabela 2) e não houve efeito de tratamento com eCG (P=0,28) ou P₄

injetável (P=0,60) na taxa de prenhez aos 32 dias. O mês em que a IATF foi realizada não alterou a taxa de prenhez aos 32 dias de gestação (P=0,13).

Tabela 2 Risco de prenhez aos 32 dias em vacas holandesas sincronizadas com protocolos à base de estradiol e progesterona e tratadas com eCG e ou progesterona

Variável	Taxa de prenhez no dia 32 % (n/n)	OR Ajustada (95% IC)*	P
Gonadotrofina			
sem eCG	35.7 (75/210)	Referência**	0.28
eCG	30.9 (58/188)	0.78 (0.51-1.19)	
Progesterona			
sem P ₄	31.5 (62/197)	Referência**	0.60
P ₄	35.3 (71/201)	1.16 (0.75-1.79)	

*OR = odds ratio; CI = intervalo de confiança.

** Referência = Grupo referência para taxa de risco ajustada.

Não houve interação entre os tratamentos (eCG e P₄) e as variáveis explanatórias (P>0,05) na taxa de prenhez aos 46 dias de gestação e na perda embrionária entre 32 e 46 dias de gestação. Além disso, não houve interação entre os tratamentos com eCG e P₄ injetável na taxa de prenhez aos 46 dias (P=0,06) e na perda embrionária entre 32 e 46 dias de gestação (P=0,35; Tabela 3). Ainda, não houve efeito de tratamento com eCG (P=0,44) ou P₄ injetável (P=0,87) na taxa de prenhez aos 46 dias e na perda embrionária (eCG, P=0,35; P₄ P=0,29). Por fim, não houve efeito das variáveis explanatórias que entraram no modelo para análise da taxa de prenhez aos 46 dias (mês da IATF, P=0,12; *Repeat breeder*, P=0,16; ECC, P=0,12) e da perda embrionária (*Repeat breeder*, P=0,21; CL no D0, P=0,07).

Tabela 3 Taxa de prenhez no dia 46 e taxa de perda embrionária em vacas holandesas sincronizadas com protocolo à base de progesterona e estradiol e tratadas com eCG e ou progesterona

Variável	Taxa de prenhez no dia 46 % (n/n)	<i>P</i>	Taxa de perda embrionária % (n/n)	<i>P</i>
Gonadotrofina				
sem eCG	31.4 (66/210)	0.44	12.0 (9/75)	0.29
eCG	28.7 (54/188)		6.9 (4/58)	
Progesterona				
sem P ₄	28.9 (57/197)	0.87	8.1 (5/62)	0.35
P ₄	31.3 (63/201)		11.3 (8/71)	

4 DISCUSSÃO

A administração de 400 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P₄ não resultou em aumento da concentração sérica de P₄ após IA e não foi efetivo em aumentar a taxa de prenhez. Esses resultados estão de acordo com os obtidos em vacas holandesas de alta produção tratadas com 400 UI de eCG três dias antes da IA (PULLEY et al., 2013) ou com 400 UI ou 600 UI de eCG no momento da remoção do implante intravaginal de P₄ (FERREIRA et al., 2013). Ferreira et al. (2013) sugeriram que vacas de alta produção, sendo alimentadas com dieta de alta energia para suportar a produção de leite, parecem não se beneficiarem com a adição de gonadotrofina. De fato, a ovulação do primeiro folículo dominante pós-parto ocorre em 75% das vacas bem alimentadas (SAVIO et al., 1990) e a incidência de anestro é maior em vacas com baixo consumo de energia comparadas às alimentadas com dietas de alta energia (WILTBANK; GUMEN; SARTORI, 2002). Segundo Gumen, Guenther e Wiltbank (2003), a maioria das vacas nos sistemas com boa alimentação possui folículos que são maiores do que o tamanho necessário para a divergência folicular, o que sugere aporte suficiente de LH para sustentar o crescimento do folículo até a ovulação.

Pesquisas sugerem que a eCG não tem efeito na fertilidade de vacas leiteiras com ECC acima de 2,75 (SOUZA; VIECHNIESKI; LIMA, 2009), assim como em vacas de leite e de corte que apresentam CL no início do protocolo de sincronização da ovulação (BARUSELLI et al., 2003; BRYAN et al., 2010; CUTAIA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004). Porém, nas vacas em anestro, os efeitos positivos da eCG estão bem estabelecidos (BARUSELLI et al., 2004; MARTÍNEZ; SIERRA, 2010). Segundo Viscarra et al. (1998),

animais com bom ECC apresentam alta taxa de ciclicidade, o que dispensa o uso de eCG. Santos, Rutigliano e Sá Filho (2009) relataram que vacas leiteiras com $ECC \leq 2,75$, que representam mais da metade de todas as vacas que não iniciam a ciclicidade até 70 dias após o parto, apresentam maior risco de serem anovulatórias e que o aumento do ECC até o momento da IA está associado ao maior risco de concepção. Esse grupo de vacas se beneficiou com o uso da mesma dosagem de eCG utilizada neste trabalho, apresentando aumento da taxa de concepção.

A melhora na taxa de concepção em resposta ao tratamento com eCG, provavelmente, está relacionada ao maior crescimento final do folículo em vacas com deficiência energética (YAVAS; WALTON, 2000), ao aumento na taxa de ovulação e à maior concentração sanguínea de P_4 após a IA (BARUSELLI et al., 2004), minimizando falhas no reconhecimento materno da gestação (MANN; HARESIGN, 2001). É provável que, nesse experimento, o uso de eCG não tenha resultado em aumento na taxa de prenhez, em comparação aos animais não tratados, porque no início do protocolo de sincronização as vacas que receberam eCG apresentaram ECC de $3,00 \pm 0,03$ e 63,8% possuíam CL.

O aumento da concentração sérica de P_4 após o tratamento com P_4 neste trabalho concorda com os de vários trabalhos em que a suplementação com P_4 injetável ou com implantes de P_4 após IA resultou em aumento da concentração sanguínea desse hormônio após o tratamento (CARTER et al., 2008; CLEMENTE et al., 2009; FORRO et al., 2012; GARRETT et al., 1988). Garrett et al. (1988) utilizando a P_4 injetável e Forro et al. (2012) utilizando implante de P_4 após a IA observaram aumento de cerca de 2 ng/mL 24 horas após o início do tratamento, conforme o observado no presente trabalho.

Vacas de leite de alta produção possuem alto metabolismo dos esteroides no fígado, ocasionado pelo maior fluxo sanguíneo porta-hepático (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002; SANGSRITAVONG et al., 2002;

WILTBANK et al., 2001). Wiltbank et al. (2001) relataram que o fluxo sanguíneo hepático em vacas lactantes foi duas vezes maior do que nas não lactantes, reduzindo a concentração sanguínea de esteroides em 25% durante o ciclo estral. Da mesma forma, Sangsritavong et al. (2002) observaram maior fluxo sanguíneo hepático e menor concentração sanguínea progesterona em vacas lactantes do que em vacas não lactantes. Neste trabalho, a produção de leite teve média de 27,7 kg/dia, sugerindo elevado fluxo sanguíneo hepático e metabolização de esteroides, ajuda a explicar o fato de que a concentração sérica de P₄ no dia 13 após IA nas vacas tratadas com P₄ injetável não foi maior do que nas não tratadas.

Em um estudo recente Kenyon et al. (2013) foi observado que a prenhez pode ser estabelecida com aumento da concentração de P₄ entre a IA e sete dias após $\geq 2,71$ ng/mL e $\geq 1,48$ ng/mL do dia sete ao dia 14 após a IA. Entretanto, a prenhez é menos provável de ser mantida se a concentração de P₄ no dia 14 for $< 5,0$ ng/mL. No presente trabalho, apesar de ter tido um aumento significativo de cerca de 2 ng/mL na concentração sérica de P₄ no dia seguinte à aplicação de P₄ injetável, a P₄ sérica foi menor que 5 ng/mL no dia 13 nas vacas tratadas e não tratadas com P₄. Essa observação pode estar relacionada à ausência de efeito do tratamento com P₄ injetável sobre taxa de prenhez.

Arndt et al. (2008) também não observaram efeito da suplementação com P₄, na forma de implante intravaginal por 14 dias após a IA, sobre a taxa de prenhez, contudo, a concentração sanguínea de P₄ após o tratamento não diferiu, o que ajuda a explicar a ausência de resultado em termos de taxa de prenhez. Por outro lado, Johnson (1958 citado por LONERGAN, 2011), utilizando 100 mg de P₄ injetável nos dias dois, três, quatro, seis, e nove após a IA, verificou aumento na taxa de concepção nas vacas tratadas e Macmillan e Peterson (1993) observaram melhor taxa de concepção em vacas tratadas com implante intravaginal de P₄ por sete dias, com início nos dias seis a oito após a IA. Essas

observações são consistentes com os resultados de uma meta-análise de 17 estudos sobre suplementação de P₄, em que os tratamentos durante a primeira semana após a IA aumentaram a taxa prenhez, mas nenhum benefício foi observado quando os tratamentos foram administrados durante a segunda e terceira semanas após IA (MANN; LAMMING, 1999). Tendência de aumento na taxa de concepção de vacas leiteiras suplementadas com P₄ na forma de implante intravaginal por sete dias, com início entre quatro e nove dias após IA, foi também observado por Stevenson et al. (2007).

Apesar do tratamento com P₄ neste trabalho ter sido realizado no momento correto, durante a primeira semana após a IA, não houve melhoria da taxa de prenhez. Tendo em vista o sucesso obtido em outros estudos nos quais o tratamento com P₄ foi realizado por vários dias após IA, é possível que a utilização de uma única e alta dose de P₄ injetável no terceiro dia após a IA não seja efetiva em melhorar a taxa de prenhez. Assim, o tratamento de maior duração e com doses diferentes da testada neste trabalho merece ser avaliado.

Outra questão diz respeito à maior concentração de P₄ no útero que pode ser obtida com o uso de implantes intravaginais, em comparação ao tratamento com P₄ injetável. Cicinelli et al. (2000) relataram que a aplicação de P₄ diretamente na vagina dobrou as concentrações de P₄ na artéria uterina de mulheres, em comparação à concentração de P₄ na artéria periférica. Além disso, quando administradas em doses que resultaram em concentrações periféricas idênticas de P₄, a concentração de P₄ em células endometriais foi 10 a 20 vezes maior após a administração vaginal do que após injeções intramusculares de P₄. Esses resultados indicam que o útero e o embrião podem ser influenciados por tratamento vaginal com P₄ por meio de implantes, embora a concentração periférica de P₄ não seja tão elevada. Os implantes podem ter aumentado a concentração local de P₄, o que resultou em melhoria da fertilidade, ao contrário da P₄ injetável.

A melhor taxa de concepção em vacas suplementados com P₄ pode ser explicada pelo fato de que o aumento da concentração sanguínea de P₄ durante os estágios iniciais de gestação aumenta o tamanho do concepto (CLEMENTE et al., 2009; GARRETT et al., 1988). Maior tamanho do concepto está relacionado à maior produção de *interferon-tau* (LONERGAN, 2011) pelas células trofoblásticas, impedindo o desenvolvimento do mecanismo luteolítico (GEISERT et al., 1992) por meio da inibição da expressão dos receptores de ocitocina nas células endometriais, que, conseqüentemente, inibe a secreção de PGF_{2α} (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001). Dessa forma, a P₄ atua em fase crítica do desenvolvimento embrionário, minimizando falhas no reconhecimento fetal.

Os efeitos positivos da concentração de P₄ na qualidade embrionária, comprimento do embrião e produção de *interferon-tau* podem ser indiretos pela ação no epitélio endometrial e glandular (LONERGAN, 2011). Além disso, o aumento da concentração de P₄ e *interferon-tau* resultou em maior transcrição dos genes relacionados ao transporte de glicose e frutose (FORDE et al., 2011). Esses dados indicam que o aumento da concentração sanguínea de P₄ no início da gestação aumenta a disponibilidade de nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário.

A perda embrionária após a concepção é um fator significativo para a reduzida taxa de prenhez nas vacas em lactação (SANTOS et al., 2004) e tratamentos que resultam no aumento da concentração sanguínea de progesterona no início da gestação têm sido avaliados na tentativa de minimizar esse problema (KENYON et al., 2013; LÓPEZ-GATIUS et al., 2004). No presente estudo, os tratamentos com eCG e com P₄ não melhoraram a sobrevivência embrionária entre o primeiro e segundo diagnóstico de gestação, porém, as melhorias tendem a ocorrer muito cedo antes do primeiro diagnóstico de gestação. A maioria das mortes embrionárias ocorrem logo após a fertilização

(SANTOS et al., 2004), com 30% até 7 dias, 40% entre o dia 8 e 17, e 24% entre 17 e 24 dias após a IA (STEVENSON et al., 2007). Os tratamentos utilizados podem ter reduzido a perda de prenhez em qualquer um desses períodos. A taxa da perda de prenhez entre 30 e 45 dias de gestação é de 0,85% ao dia ou de 12,8% (SANTOS et al., 2004), valores que coincidem com os encontrados neste trabalho.

4 CONCLUSÃO

A adição de 400 UI de eCG e/ou 600 mg de P₄ em protocolos de IATF em vacas leiteiras não aumentou a taxa de prenhez e não reduziu a perda embrionária. O tratamento com P₄ injetável foi eficiente apenas em aumentar a concentração de P₄ 24 horas após a aplicação. A falta de efeitos positivos de eCG no presente estudo pode ser explicado pela baixa porcentagem de vacas com baixo ECC e em anestro. Mais trabalhos são necessários para determinar como e quando a aplicação de P₄ injetável pode influenciar a taxa de prenhez.

REFERÊNCIAS

ARNDT, W. J. et al. Effect of post-insemination progesterone supplementation on pregnancy rate in dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 73, p. 271–274, 2008.

BARUSELLI, P. S. et al. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós-parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2003, Gramado. **Proceedings...** Gramado: [s. n.], 2003. v. 1, p. 380.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anoestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82, p. 479–486, 2004.

BRYAN, M. A. et al. Use of equine chorionicgonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 22, p. 126–131, 2010.

CARTER, F. et al. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 20, p. 368–75, 2008.

CLEMENTE, M. et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, Cambridge, v. 138, p. 507–17, 2009.

CHEBEL, R. C. et al. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, p. 239–255, 2004.

CICINELLI, E. et al. Direct transport of progesterone from vagina to uterus. **Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 95, p. 403–406, 2000.

CUTAIA, L. et al. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, Stoneham, v. 59, p. 216, 2003.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 41–49, 2001.

FERREIRA, R. M. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 26–33, July 2013.

FORDE, N. et al. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 84, p. 266–278, 2011.

FORRO, A. et al. Combined use of Ovsynch and progesterone supplementation after artificial insemination in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 4372–4381, 2012.

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

GEISERT, R. D. et al. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v. 4, p. 301–305, 1992.

GUMEN, A.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovularlactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 3184–3194, 2003.

JOHNSON, K. R. Effect of 17 alpha-hydroxyprogesterone 17-ncaproate on the reproductive performance of cattle. **Annals the New York Academy of Sciences**, New York, v. 71, p. 577–579, 1958.

KENYON, A. G. et al. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 136, n. 4, p. 223-230, Jan. 2013.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, p. 1594-1601, 2011.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 1529–1535, 2004.

MACMILLAN, K. L.; A. J. PETERSON. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, p. 1–25, 1993.

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

MARQUES, M. O. et al. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Proceedings...** Córdoba: [s. n.], 2003. p. 392.

MARTÍNEZ, C.; SIERRA, I. **Efecto de la aplicación de eCG al momento del retiro del implante intravaginal DIV-B® sobre los porcentajes de inducción de celo y preñez en vacas lecheras con anestro pos parto.** 2010. 17 p. Proyecto especial (Graduación del programa de Ingeniería Agronómica) - Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 2010.

PULLEY, S. L. et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, p. 127-134, 2013.

ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 202-207, 1989.

RODRIGUES, C. A. Aumento da taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com uso de eCG em diferentes períodos pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32. p. 220, 2004.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows, **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p. 651–658, 2010b.

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

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-anestrus Nelore beef cows, **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, p. 12–18, 2011.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2831–2842, 2002.

SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 513–535, 2004.

SANTOS, J. E. P.; RUTIGLIANO, H. M.; SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, p. 207–221, 2009.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2813-2822, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT1**: user's guide (Release 8.2). Cary, 2001.

SAVIO, J. D. et al. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 569–579, 1990.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 10-21, 2009.

STEVENSON, J. S. et al. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 331-40, 2007.

VISCARRA, J. A. et al. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin and non-esterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 493-500, 1998.

WILTBANK, M. C. et al. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 32, 2001. (Suppl.1).

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

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 25-55, 2000.