



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Retorno à ciclicidade ovariana e indução da ovulação em vacas

Nelore utilizando eCG e GnRH

João Luiz Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Melhoramento Genético e Reprodução Animal.

Sinop, Mato Grosso

Maior de 2017

João Luiz Barbosa

**Retorno à ciclicidade ovariana e indução da ovulação em vacas
Nelore utilizando eCG e GnRH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Melhoramento Genético e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lílían Rigatto Martins

Co-orientador: Prof. Dr. James Richard Pursley

Sinop, Mato Grosso

Maio de 2017

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e de pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B238r Barbosa, João Luiz.

Retorno à ciclicidade ovariana e indução da ovulação em vacas Nelore em anestro utilizando eCG e GnRH / João Luiz Barbosa. -- 2017

40 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Lílian Rigatto Martins.

Co-orientador: James Richard Pursley.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Sinop, 2017.

Inclui bibliografia.

1. anestro. 2. IATF. 3. vacas de corte. 4. crescimento folicular. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Avenida Alexandre Ferronato, 1200 - Reserva 35 - Distrito Industrial - Cep: -Sinop/MT
Tel : - Email : ppgzootecnia@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Retorno á ciclicidade ovariana e indução da ovulação em vacas Nelore utilizando eCG e GnRH"

AUTOR : Mestrando JOAO LUIZ BARBOSA

João Luiz Barbosa

Dissertação defendida e aprovada em 03/05/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador	Doutor(a)	Lilian Rigatto Martins
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Examinador Externo	Doutor(a)	CELY MARINI MELO ONA
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Examinador Externo	Doutor(a)	Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	
Examinador Suplente	Doutor(a)	FABIO JOSE LOURENCO
Instituição :	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO	

SINOP, 18/07/2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Ele, que sempre me dá força nos momentos difíceis, quando estou longe das pessoas que amo e que me fortalece quando penso em fraquejar.

Aos meus pais, **Marcelo Naves Barbosa** e **Márcia Inês Vial Barbosa**, que sempre apoiaram meus estudos, mesmo em momentos de dificuldade. Eles sempre foram os pilares para a formação do meu caráter e o porto seguro para onde sei que sempre vou poder voltar.

Aos meus irmãos, **Marcelo Naves Barbosa Júnior** e **Gabriel Vial Barbosa**. Mesmo longe, não mediram esforços para que nos mantivéssemos unidos.

Ao meu amor, **Camila Schirmer**, que apesar da distância, sempre esteve ao meu lado e nunca mediu esforços para encurtar a distância e sempre nos aproximar.

Aos meus avós maternos, **Luiz Vial** e **Eleida Maria Vial**, por sempre terem contribuído com minha educação, pelo ensinamento das primeiras sílabas que formei.

Aos meus avós paternos, **João Gonçalves Barbosa** e **Maria José Naves Barbosa** por sempre me incentivarem a estudar, pois mesmo sendo pessoas que não tiveram essa oportunidade, reconheceram a importância do estudo ao longo da vida e contribuíram para minha formação.

Imensamente, à **Prof.^a Dr.^a Lillian Rigatto Martins**, pela orientação, pela paciência, pelo companheirismo, pela amizade que foi formada durante esses dois anos e por ser um exemplo a ser seguido de uma pessoa ética, correta e que tenho certeza que não mede esforços e se preocupa com o aprendizado dos seus alunos, mesmo com as dificuldades, limitações e desvalorização que alguns profissionais sofrem em algumas instituições.

Ao **Prof. James Richard Pursley**, da *Michigan State University*, pela valiosa contribuição durante o delineamento experimental e pelo auxílio na interpretação dos dados.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução Animal, **Alisson da Mota Santos**, **Fernando Barbosa Kachiyama** e **Janaína da Silva Pimentel**, por toda colaboração durante

a execução dos experimentos e pelo apoio. Agradeço também ao **Júnior Barbosa Kachiyama, Edésio José Soares, Camila Piovezan Ribas de Oliveira e Wesley Nascimento dos Reis**, que contribuíram de alguma forma para que o caminho que foi percorrido durante estes dois anos fosse mais suave.

Agradeço aos produtores rurais **Comercindo Tomelin e Marcelo Naves Barbosa** e à **Rio Bravo Agropecuária S.A.** por cederem gentilmente suas propriedades e seus animais para que os experimentos pudessem ser desenvolvidos.

Agradeço também aos meus amigos de Rondônia, **Evair Moreira de Souza, José Carlos dos Santos e Jorge Diego Alves da Silva**, que sempre compreenderam o tempo que fiquei longe e que, mesmo ficando muito tempo sem nos vermos, a amizade construída não diminuiu.

À **Prof.^a Dr.^a Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis** e à **Prof.^a Dr.^a Cely Marini Melo Oña**, pelo aceite do convite para composição de minha banca de defesa de dissertação e por serem um instrumento de contribuição para minha formação.

Ao **Programa de Pós-graduação em Zootecnia**, da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - Fapemat**, pelo apoio financeiro ao projeto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, pela concessão da bolsa de Mestrado.

EPÍGRAFE

E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida incomode, eu sei quem sou, e sei pelo que devo lutar. Se acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha fé.

Tião Carreiro

BIOGRAFIA

JOÃO LUIZ BARBOSA, filho de Marcelo Naves Barbosa e Márcia Inês Vial Barbosa, nasceu no dia 21 de fevereiro de 1991, na cidade de Espigão do Oeste no estado de Rondônia.

Tornou-se bacharel em Medicina Veterinária, em maio de 2014, pela Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus de Sinop.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração de Melhoramento Genético e Reprodução Animal pela mesma instituição, em março de 2015, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 03 de maio de 2017.

RESUMO

BARBOSA, João Luiz. Dissertação de Mestrado (Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop. Maio de 2017, 40f. **Retorno à ciclicidade ovariana e indução da ovulação de vacas Nelore utilizando eCG e GnRH.** Orientadora: Prof.^a Dr.^a LÍlian Rigatto Martins. Co-orientador: Dr. James Richard Pursley

O objetivo geral da pesquisa foi desenvolver um protocolo baseado em eCG, GnRH e PGF₂ α que induza o retorno à ciclicidade de vacas Nelore em anestro. Para isso foram construídos dois experimentos. O experimento I teve como objetivos específicos determinar o intervalo de dias entre a aplicação da eCG e o momento de aquisição de capacidade ovulatória e determinar o percentual de vacas que ovularam em resposta à administração de GnRH. Já o experimento II teve como objetivos específicos determinar a taxa de ovulação após a primeira e após a segunda injeção de GnRH em vacas submetidas a um protocolo eCG-GnRH-PGF-GnRH. No experimento I (n = 20), a porcentagem de vacas que apresentou folículos com capacidade ovulatória dois dias após a aplicação de 800 UI, 400 UI e 0 UI de eCG foi de 100%, 71,42% e 66,66%, respectivamente. A taxa de ovulação após uma única injeção de GnRH, foi de 100%, 85,7% e 66,66%, respectivamente e, não houve diferença em função da aplicação ou não da eCG sobre a taxa de ovulação ($P = 0,17$). No experimento II, as vacas (n = 21) receberam 400 UI de eCG (Dia 0), seguida por GnRH (D2), PGF₂ α (Dia 8) e GnRH (D10). A porcentagem de animais que respondeu à primeira injeção de GnRH foi maior que a segunda, (71,42% vs. 19,04%, $P < 0,001$), sendo que 23,8% dos animais não responderam a nenhuma das injeções de GnRH. Desta forma, a eCG é efetiva em induzir a emergência de uma nova onda folicular dois dias após sua aplicação em vacas Nelore em anestro e, portanto, efetiva em auxiliar o retorno à ciclicidade. O protocolo baseado no uso de eCG, GnRH e PGF₂ α foi eficiente em induzir a ovulação sincronizada da maior parte dos animais após a primeira injeção de GnRH, porém, não após a segunda. Desta forma, pesquisas adicionais são necessárias a fim de melhorar a eficiência deste protocolo com relação à taxa de vacas com ovulação sincronizada à segunda injeção de GnRH.

Palavras-chave: anestro, IATF, vacas de corte, crescimento folicular.

ABSTRACT

BARBOSA, João Luiz. Master Thesis (Animal Science), Federal University of Mato Grosso, Campus Sinop. May 2017, 40 pages. **Resumption of ovarian cyclicity and ovulation induction of Nelore cows using eCG and GnRH.** Advisor: Prof. Dr. Lílian Rigatto Martins. Co-advisor: Dr. James Richard Pursley

The objective of this study was to develop a protocol based on eCG, GnRH and PGF₂ α to induce resumption of cyclicity in anovular Nelore cows, for which two experiments were conducted. Experiment I aimed to determine the day interval between eCG injection and acquirement of ovulatory capacity and to estimate the percentage of cows that ovulated in response to GnRH injection. Experiment II was designed to determine the ovulation rate after the first and second injection of GnRH of cows that were submitted to a eCG-GnRH-PGF-GnRH protocol. In Experiment 1 ($n = 20$), the percentage of cows that presented follicles with ovulatory capacity within two days after the administration of 800, 400, and 0 IU of eCG was 100%, 71.42%, and 66.66%, respectively. The ovulation rate after a single GnRH injection was 100%, 85.7%, and 66.66%, respectively; and there was no difference between eCG administration and none on the ovulation rate ($P = 0,17$). In Experiment 2, cows ($n = 21$) received 400 IU of eCG on Day 0, followed by GnRH (Day 2), PGF₂ α (Day 8) and GnRH (Day 10). The percentage of cows that responded to the first GnRH injection was higher than to the second, (71.42% vs. 19.04%, $P < 0.001$), considering that 23,8% of cows did not respond to any GnRH injection. Therefore, eCG is effective on inducing emergence of a new follicular wave within two days after its administration in anestrous Nelore cows; hence, it is effective to support the resumption of cyclicity. The protocols based on the administration of eCG, GnRH and PGF₂ α have been effective in inducing synchronized ovulation in the majority of cows after the first GnRH injection; however, not as effective after the second injection of GnRH. Consequently, additional studies are essential to enhance the efficiency of this protocol concerning the synchronized ovulation rate following the second GnRH injection.

Keywords: anestrus, FTAI, beef cattle, follicular development.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de dias após a aplicação da eCG necessários para que os animais apresentassem folículo com capacidade ovulatória.....	29
Gráfico 2: Taxa de ovulação em vacas Nelore em anestro do grupo controle, do grupo tratado com 400UI de eCG e do grupo tratado com 800 UI de eCG.....	30
Gráfico 3: Distribuição das respostas apresentadas pelos animais tratados com o protocolo eCG, GnRH, PGF ₂ α e GnRH	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Meia-vida de eliminação da eCG em relação à espécie em que foi administrada...4

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

CL: Corpo lúteo

Da: Daltons

DIV: Dispositivo intravaginal

ECC: Escore de condição corporal

eCG: Gonadotrofina coriônica equina

FADF: Ficha de acompanhamento de dinâmica folicular

FDA: *Food and Drug Administration*

FSH: Hormônio folículo estimulante

GLM: Modelo linear generalizado

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

IA: Inseminação artificial

IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

LH: Hormônio luteinizante

MO: Monitoramento ovariano

mm³: Milímetros cúbicos

ng: Nanogramas

P4: Progesterona

PEV: Período de espera voluntária

PGF₂ α : Prostaglandina F₂alfa

PMSG: Gonadotrofina sérica da égua prenhe

StAR: Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TETF: Transferência de embrião em tempo fixo

μ g: Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Histórico da eCG.....	2
2.2. Propriedades físicas e químicas da eCG	3
2.3. Respostas ovarianas ao tratamento com eCG	5
2.4. Uso da eCG em protocolos de IATF.....	8
2.5. Principais tipos de protocolos utilizados para IATF no Brasil	10
2.6. Uso de dispositivos intravaginais em protocolos de IATF	11
2.7. Protocolos de IATF alternativos que dispensam o uso dos DIV	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO I.....	23
RETORNO À CICLICIDADE OVARIANA E INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM VACAS NELORE UTILIZANDO eCG E GnRH.....	23
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Experimento I.....	26
2.1.1. Animais.....	26
2.1.2. Delineamento experimental.....	26
2.1.4. Monitoramento Ovariano	27
2.1.5. Análise Estatística.....	27
2.2. Experimento II	27
2.2.1. Animais.....	27
2.2.3. Tratamento.....	28
2.2.4. Monitoramento Ovariano	28
2.2.5. Análise Estatística.....	28
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Experimento I.....	28
3.2. Experimento II	31
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO.....	40

1. INTRODUÇÃO GERAL

Existem diversos fatores que influenciam a reprodução animal, dentre eles, destacam-se a sanidade, o manejo reprodutivo e a nutrição (Sartori e Guardieiro, 2010). No Brasil, devido às condições tropicais, a maior parte do rebanho é composta por animais zebuínos, visto que estes animais apresentam alta rusticidade e se adaptam bem ao clima brasileiro, porém apresentam alta incidência de um longo anestro, começando pelo anestro pós-parto, seguido de anestro nutricional (Baruselli et al., 2008).

O anestro é uma condição em que as fêmeas não ovulam devido à liberação inadequada de gonadotrofinas (Oliveira et al., 2010). Aliado a esta característica, o sistema de criação extensivo, predominante nas regiões tropicais, e a sazonalidade climática favorecem ainda mais o comprometimento da atividade ovariana, devido ao baixo conteúdo energético fornecido pelas pastagens no período seco do ano (Baruselli et al., 2008).

Diante desta questão, várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para minimizar o efeito do anestro no desempenho reprodutivo, sendo as suplementações pré e pós-parto, ferramentas eficientes e de fácil implantação que trazem resultados positivos desde que bem planejadas e executadas dentro da propriedade (Baruselli et al., 2004).

Além da suplementação, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) têm sido associados ao manejo para diminuir o tempo de anestro das fêmeas bovinas e induzir a ciclicidade por meio da utilização de fármacos. Com o desenvolvimento da ultrassonografia, foi possível compreender a dinâmica de crescimento dos folículos ovarianos e manipular o ciclo estral. Inicialmente, os primeiros protocolos desenvolvidos foram direcionados para fêmeas taurinas leiteiras, como o protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1995). No entanto, este protocolo não trouxe resultados satisfatórios em animais zebuínos, uma vez que a grande parte destes animais se encontra em anestro durante alguns períodos do ano e, portanto, possui

baixos estoques de hormônio luteinizante (LH) necessários para a ovulação, tornando os protocolos à base de estrógeno e de progesterona (P4) os mais utilizados nestes animais.

A partir dos anos 70, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) passou a ser utilizada com o objetivo de aumentar a eficiência dos protocolos, tanto de inseminação artificial em bovinos como de transferência de embriões (Lunenfeld, 2004). Atualmente, o uso da eCG é indispensável em protocolos que visem ao retorno à ciclicidade de vacas em anestro, visto que o uso da eCG traz significativas vantagens, uma vez que ela fornece o suporte de LH necessário para que o folículo cresça até atingir capacidade ovulatória (Mello et al., 2014).

O objetivo geral da pesquisa foi desenvolver um protocolo baseado em eCG, GnRH e PGF_{2α} que induza o retorno à ciclicidade de vacas Nelore em anestro. Para isso foram construídos dois experimentos. O experimento I teve como objetivos específicos determinar o intervalo de dias entre a aplicação da eCG e o momento de aquisição de capacidade ovulatória e determinar o percentual de vacas que ovularam em resposta à administração de GnRH. Já o experimento II teve como objetivos específicos determinar a taxa de ovulação após a primeira e após a segunda injeção de GnRH em vacas submetidas a um protocolo eCG-GnRH-PGF-GnRH.

O artigo foi formatado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da eCG

A eCG ou, como era chamada anteriormente, gonadotrofina sérica da égua prenhe (PMSG), foi descoberta na década de 1920 por Harold Cole e George Hart e descrita pela primeira vez em seu artigo em 1930 (Cole e Hart, 1930).

Cerca de oito anos após ter sido descoberta, foi estabelecido um padrão internacional para o uso da eCG em protocolos para indução da ovulação em humanos junto com a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Lunenfeld, 2004). Entretanto, algumas mulheres passaram a desenvolver anticorpos contra a eCG e, dessa forma, os medicamentos contendo gonadotrofinas coriônicas de origem animal, que eram utilizados em humanos, foram retirados do mercado e, conseqüentemente, excluídos dos programas de indução da ovulação em mulheres em 06 de julho de 1972 pela *Food and Drug Administration* (FDA), tendo então seu uso restrito a animais (FDA, 1972).

2.2. Propriedades físicas e químicas da eCG

A eCG é uma glicoproteína ácida produzida pelos cálices endometriais de éguas prenhes e começa a ser detectada no soro entre o 37° e 41° dia da gestação, com pico de produção entre o 60° e 80° dia quando, a partir do 120° seus níveis séricos começam a cair e finalmente desaparecem até o 160° dia (Mestre et al., 2011).

A molécula da eCG é sintetizada e secretada sob a forma de um heterodímero clássico, ou seja, composta por duas subunidades α e β , ligadas não covalentemente, assim como as gonadotrofinas hipofisárias (Murphy e Martinuk, 1991). Cada uma destas subunidades é composta por uma série de aminoácidos. O gene responsável pela codificação da subunidade α codifica uma proteína que possui 96 aminoácidos e apresenta entre 68 a 79% de homologia com a subunidade α de outras espécies de mamíferos. Já o gene responsável pela codificação da subunidade β codifica uma proteína de 169 aminoácidos, porém o processamento resulta na clivagem de um aminoácido na porção N-terminal, resultando em uma molécula madura com 149 aminoácidos que possui de 56 a 78% de homologia com a subunidade β de outros mamíferos (Mestre et al., 2011).

A eCG possui uma quantidade elevada de carboidratos, superando qualquer outra glicoproteína conhecida. Cerca de 22% da subunidade α e mais de 50% da subunidade β são compostas por carboidratos, sendo a maior parte composta por N-acetil-neuramina (ácido siálico), por galactose e por glucosamina (Murphy e Martinuk, 1991). Este alto teor de carboidratos (45%) lhe garante um alto peso molecular, de 72.000 Da, que confere uma longa meia-vida à eCG (Mestre et al., 2011). Ainda, por sua alta carga negativa devido ao alto grau de glicosilação, sua taxa de filtração pelo glomérulo renal é diminuída, o que aumenta ainda mais sua meia-vida (Baruselli et al., 2008). O **quadro 1** sumariza a meia-vida da eCG em algumas espécies animais.

Quadro 1 - Meia-vida de eliminação da eCG em relação à espécie em que foi administrada.

Animal	Meia-vida de eliminação (horas)	Fonte
Égua	144	Mestre et al. (2011)
Vaca	121	Schams et al. (1978)
Ovelha	61	Murphy e Martinuk (1991)
Coelha	26	Catchpole et al. (1935)
Rata	06	Aggarwal e Papkoff (1985)

As informações sobre a meia-vida da eCG são um tanto contraditórias, pois alguns autores levam em consideração a meia-vida de distribuição, enquanto outros consideram a meia-vida de eliminação. Quando se leva em consideração a meia-vida de distribuição, tem-se 45,6 horas para bovinos; 3 a 4 horas para a ovinos e 0,3 horas para ratos (Schams et al., 1978; Murphy e Martinuk, 1991; Aggarwal e Papkoff, 1985).

Juntamente com as gonadotrofinas LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), a eCG pertence a uma subfamília de hormônios glicoproteicos que utilizam receptores de domínio transmembrana associados a uma proteína G; dessa forma, a eCG consegue se ligar a estes receptores presentes na superfície das células da teca e da

granulosa dos folículos e exercer as mesmas funções do FSH e LH em outras espécies, que não a equina (Murphy, 2012). Esta característica possibilita o amplo uso da eCG em biotecnologias reprodutivas voltadas à espécie bovina, como nos protocolos de superovulação utilizados em programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) e em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), uma vez que, devido ao suporte hormonal, aumenta a taxa de crescimento folicular; a eficiência do corpo lúteo em produzir progesterona e, principalmente, auxilia o retorno à ciclicidade de vacas em anestro (Baruselli et al., 2008).

2.3. Respostas ovarianas ao tratamento com eCG

Vários trabalhos indicam que o uso da eCG em programas de manipulação do ciclo estral resulta numa maior velocidade de crescimento folicular. Dados apresentados por Nuñez-Oliveira et al. (2014) apontam taxas de crescimento folicular, em vacas Hereford, de 0,90 mm/dia para as que não receberam eCG e de 1,40 mm/dia para as que receberam 300 UI de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal ($P = 0,0777$). Em experimento realizado com novilhas *Bos taurus indicus*, Sá Filho et al. (2010a) encontraram taxas de crescimento folicular inferiores quando comparadas com os resultados apresentados acima, embora estes autores tenham observado ainda, que as novilhas tratadas com 400 UI eCG tiveram um incremento da taxa de crescimento folicular em relação àquelas que não receberam a eCG (1,10 vs. 0,60 mm/dia, respectivamente; $P = 0,0009$). Em outra pesquisa realizada com vacas *Bos taurus indicus*, Sá Filho et al. (2010b) relataram que a taxa de crescimento folicular foi similar àquela observada por Nuñez-Oliveira et al. (2014) em *Bos taurus taurus*, de 1,50 mm/dia para as vacas tratadas com 400 UI de eCG e de 0,56 mm/dia para aquelas não tratadas ($P = 0,0001$).

Ainda neste contexto, é sabido que após o momento do desvio, o folículo expressa receptores para LH nas células da granulosa além daqueles presentes nas células da teca

interna (McNatty et al., 1984) e, dessa forma, a injeção da eCG aumenta a capacidade esteroidogênica do folículo ao se ligar aos receptores de LH e atuar como tal de forma tônica, resultando em uma maior quantidade de estrógeno produzido e liberado no antro folicular (De Rensis et al., 2014).

Sá Filho et al. (2010c), utilizando vacas Nelore paridas e mestiças (Nelore x Angus), mostraram que quando se aumentou a taxa de crescimento folicular final, a taxa de ovulação também foi maior. Nesta pesquisa, os autores observaram que conforme o diâmetro folicular das vacas aumentava para além de 15 mm, a taxa de ovulação chegava à aproximadamente 100%, enquanto que nos animais que apresentaram diâmetro folicular final próximo a 10 mm, a taxa de ovulação não ultrapassou 80%. Nesta mesma pesquisa, os autores afirmaram que a demonstração de estro e a taxa de prenhez também aumentaram conforme o diâmetro folicular final foi maior. Em contrapartida, Ferreira et al. (2013) não encontraram diferenças na taxa de ovulação em vacas holandesas com bom escore de condição corporal ($2,8 \pm 0,1$, escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5, extremamente gorda), corroborando com Baruselli et al. (2004), que não constatarem efeitos positivos na taxa de concepção com o uso da eCG em vacas Nelore com escore corporal acima de 3 (escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5, extremamente gorda).

Baruselli et al. (2008) demonstraram que a eCG atua como coadjuvante em protocolos de retorno à ciclicidade, ao afirmarem que a administração da eCG mesmo em animais em anestro criava condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação em animais que tinham comprometimento na liberação de gonadotrofinas, como fêmeas em anestro e recém-paridas. Sua ação tônica semelhante ao LH é utilizada como suporte para o crescimento folicular final nestes animais, uma vez que eles possuem baixos estoques deste hormônio quando estão sob estresse nutricional, não permitindo que ocorra o crescimento final folicular e a posterior ovulação (Pacala et al., 2010; Rostami et al., 2011). Porém, o efeito da eCG em

vacas leiteiras para a retomada da ciclicidade é limitado, pois nestas vacas a incidência de anestro devido à baixa pulsatilidade de LH é menor quando comparada com vacas de corte (Wiltbank et al., 2002).

Além do aumento no diâmetro folicular, a eCG possui efeito positivo sobre o corpo lúteo (CL) quando administrada antes da ovulação (De Rensis et al., 2014). Com a ovulação de um folículo de maior diâmetro, o corpo lúteo resultante também será maior (Nuñez-Oliveira et al., 2014). Tortorella et al. (2013) constataram que vacas que ovularam folículos de 10 mm possuíam maior área de CL e maior concentração de progesterona circulante quando comparadas às vacas que ovularam folículos de 8,5 mm ($P < 0,05$). Em outra pesquisa, Souza et al. (2009) apontaram que a eCG era capaz de aumentar a produção de progesterona pelo CL sem alteração no seu tamanho. Neste experimento, os autores não observaram aumento do tamanho do folículo ovulatório de vacas holandesas tratadas com eCG, porém detectaram aumento nos níveis de progesterona circulante e acreditaram que este aumento se deva a uma elevação na proporção e na eficiência de produção de das células grandes luteais que são responsáveis por 80% da produção de progesterona pelo CL.

Em contrapartida, Rigoglio et al. (2013) e Nuñez-Oliveira et al. (2014) evidenciaram que o uso da eCG em vacas mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) e em vacas puras (*Bos taurus taurus*) aumenta a área e a eficiência do CL quando comparado com animais que não foram tratados com a gonadotrofina.

Ainda, Rigoglio et al. (2013) demonstraram que vacas que receberam 400 UI de eCG apresentaram maior número e maior densidade de células grandes luteais por mm³ de CL, além de possuírem maior volume mitocondrial nas células luteais quando comparadas com vacas que não foram tratadas com eCG. Estes mesmos autores verificaram que em vacas tratadas com a eCG, houve maior expressão da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR). Esta proteína é mediadora da internalização do colesterol para o interior da

membrana mitocondrial (Stocco, 2001). Em síntese, vacas submetidas à estimulação com eCG, apresentam maior número de células grandes luteais, maior número de organelas envolvidas na produção da progesterona e maior expressão das proteínas responsáveis por internalizar o colesterol para dentro da membrana mitocondrial.

O aumento do volume mitocondrial é outra hipótese relacionada ao aumento da eficiência do CL em produzir progesterona, visto que esta organela é responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona, composto precursor da progesterona (Senger, 2003).

Sabendo da função essencial da progesterona para a manutenção da prenhez, torna-se vantajoso o uso da eCG para aumentar os níveis séricos deste hormônio mesmo em animais nos quais a eCG tem pouco efeito sobre o crescimento folicular, como no caso de vacas holandesas bem nutridas e vacas com escore corporal acima de 3 (Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2004; Souza et al., 2009; Ferreira et al., 2013).

Além da importância sobre a manutenção da prenhez, a concentração sérica de progesterona tem efeito sobre a qualidade do oócito ovulado (Sartori et al., 2002a) e sobre a duração da fase progesterônica do ciclo estral (Inskeep, 2004). Nuñez-Oliveira et al. (2014) observaram que vacas não tratadas com eCG apresentaram maior incidência de fase luteal curta, ou seja, as concentrações de progesterona se reduziam a menos que 1 ng/mL após o 12º dia após a ovulação. Em contrapartida, as vacas tratadas com eCG possuíam fase luteal normal com concentrações de progesterona acima de 1 ng/mL até o 14º dia após a ovulação, último dia em que os autores realizaram a mensuração, o que corrobora com os resultados de Inskeep (2004) que afirma que a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é prematura quando o útero não é exposto à progesterona.

2.4. Uso da eCG em protocolos de IATF

Embora existiram algumas controvérsias em relação à eficiência da eCG em protocolos de IATF (Marques et al., 2003; Baruselli et al., 2009), seu uso no momento da retirada do implante intravaginal é frequente em protocolos de IATF à base de progesterona e de estrógeno no Brasil, pois favorece o crescimento folicular e a ovulação mesmo em animais acíclicos, naqueles que se encontram no período de espera voluntária e naqueles com baixa condição de escore corporal (Baruselli et al., 2003, 2004; Penteado et al., 2004; Sá Filho et al., 2010a).

Bó et al. (2007) constataram que animais destinados à IATF deveriam apresentar escore de condição corporal entre 2,5 e 3 (escala de 1 a 5) para que a taxa de prenhez fosse de aproximadamente 50%. Com a utilização da eCG, foi possível atingir as mesmas taxas em animais com escore corporal próximo de 2 (escala de 1 a 5) (Baruselli et al., 2004), embora Bó et al. (2007) recomendem que os animais aumentem seu escore de condição corporal durante a estação reprodutiva, pois animais que perdem peso durante protocolos de IATF apresentam menores taxas de prenhez mesmo com o uso da eCG. Ainda neste contexto, Baruselli et al. (2009) afirmam que quando tratamentos para sincronização da ovulação para IATF são feitos antes de 60 dias pós-parto, o uso da eCG é recomendado para todos os animais independente da condição corporal.

Várias tentativas de melhorar os índices dos protocolos de IATF vêm sendo desenvolvidas; um exemplo é a associação de FSH no momento da retirada do implante intravaginal. Entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios; Sales et al. (2011), que não encontraram diferença entre a taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF tratadas com FSH e de vacas não tratadas (60,0% vs. 61,5%, respectivamente), a despeito de terem observado, no mesmo experimento, o aumento na taxa de prenhez dos animais tratados com a eCG (71,6%; $P = 0,04$).

Bó et al. (2007) ressaltaram a importância da nutrição em programas de IATF e demonstraram que programas de melhoramento que não respeitam a sazonalidade ou a falta de alimento durante o protocolo podem apresentar taxas de prenhez próximas à 35% mesmo com o uso da eCG.

2.5. Principais tipos de protocolos utilizados para IATF no Brasil

Atualmente, a maioria dos protocolos utilizados para sincronização de estro e para o restabelecimento de atividade ovariana utilizada na América do Sul é baseada em associações de progesterona e de compostos estrogênicos no dia zero (Bó et al., 2013). Estes protocolos são baseados em três premissas: sincronização da emergência de uma nova onda, que é feita através da indução da atresia folicular (Bó et al., 1995); dessa forma, um novo grupo de folículos é recrutado; pelo controle da duração da fase progesterônica, por meio da inserção de um dispositivo liberador de progesterona e posteriormente, pela aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta premissa garante o crescimento dos folículos recrutados após a sincronização da emergência de uma nova onda até a aquisição de capacidade ovulatória (Baruselli et al., 2013). Em novilhas Nelore, a aquisição da capacidade ovulatória se dá a partir do momento 7 mm, porém com maior percentual de ovulação em folículos maiores que 8,5 mm (Gimenes et al., 2008). A última premissa é a indução da ovulação sincronizada deste folículo, que pode ser feita através da aplicação de compostos estrogênicos, GnRH ou o próprio LH (Baruselli et al., 2013).

Protocolos baseados nesta associação apresentam taxa de concepção em torno de 50%, aliado ao fato de que podem ser utilizados tanto em animais cíclicos quanto em animais acíclicos sem prejuízo à taxa de concepção (Baruselli et al., 2004). Embora seja eficiente e traga inúmeras vantagens para a reprodução animal, ele possui algumas desvantagens; a

principal delas é a utilização de dispositivos intravaginais (DIV) liberadores de progesterona e, tais desvantagens serão discutidas adiante no decorrer da revisão.

2.6. Uso de dispositivos intravaginais em protocolos de IATF

Os dispositivos intravaginais (DIV) liberadores de progesterona são fundamentais em protocolos baseados na associação de estrógeno e progesterona; permanecem no canal vaginal por 5 a 9 dias e sua função é liberar progesterona por este período de tempo (Baruselli et al., 2004). Entretanto, sua utilização traz algumas desvantagens, tais como a perda destes dispositivos após a implantação; a associação do seu uso com o aumento de reações inflamatórias na cérvix e principalmente no canal vaginal; o alto custo e a demanda maior de mão de obra no momento da implantação (Roche et al., 1976; Nascimento et al., 2008; Bó, 2010).

A perda de tais dispositivos varia entre 2,7 a 12%, de acordo com o tipo de criação dos animais (à pasto ou estabulados), com o tipo de implante e com a eficiência na implantação (Roche et al., 1976; Chenault et al., 2003). A fim de atuar como coadjuvante no tratamento de inflamações do trato reprodutivo no momento da implantação do DIV, Walsh et al. (2008) utilizaram uma pomada a base de clorexidina. Esses autores associaram a maior taxa de perda dos DIV como o uso desta pomada. A perda destes DIV implica tanto em redução da eficiência do protocolo como em prejuízo financeiro para o produtor.

Dentre as reações inflamatórias associadas ao uso dos DIV, destacam-se a vaginite e a cervicite, que são patologias caracterizadas por uma alteração inflamatória inespecífica (Nascimento e Santos, 2008). Devido à resistência que fêmeas adultas geralmente possuem aos microrganismos patogênicos, a cervicite e a vaginite não são tão frequentes quanto a endometrite. Esta resistência natural deve-se ao tipo de epitélio (estratificado pavimentoso), à presença de ácido lático e às células de defesas locais. Quando este epitélio é lesionado, quer

seja pela inserção de dispositivos intravaginais, de aplicadores universais ou de inovuladores, tem-se uma predisposição à estas reações inflamatórias, que quando ocorrem, caracterizam-se clinicamente por hiperemia e pela presença de exsudato catarral e, histologicamente, pela presença de infiltrado inflamatório (Nascimento e Santos, 2008).

Aliado a isto, a presença do DIV por mais de sete dias causa uma diminuição dos leucócitos, sendo coadjuvante para o agravamento do processo inflamatório (Walsh et al., 2008). Chenault et al. (2003) verificaram que 65% das vacas analisadas em seu estudo (n = 863) apresentaram muco decorrente da irritação local causada pelo DIV e que 2% dos animais apresentavam quantidade de muco intensa, sugestiva de vaginite, corroborando com os achados de Mansano et al. (2013). Estes últimos autores relatam que o uso dos DIV envolve o manuseio direto das genitálias interna e externa e que a ação local da progesterona induz a supressão das células de defesa e interfere na imunidade do trato reprodutivo, favorecendo o aparecimento destas patologias.

Por outro lado, Walsh et al. (2008) não encontraram diferenças na diminuição do número de leucócitos e no grau de vaginite, quando compararam dispositivos com e sem progesterona, porém, no mesmo trabalho, vacas nas quais não foram inseridos dispositivos intravaginais não apresentaram nenhum tipo de corrimento vaginal e nem diminuição do número de leucócitos.

Pelo fato dos DIV serem responsáveis pelo maior custo - cerca de 40% - comparado àqueles dos demais hormônios utilizados em um programa de IATF (Bó, 2010), uma estratégia surgiu para diluir este custo, sem prejuízo na taxa de concepção: a reutilização dos DIV (Colazo et al., 2004). Bó (2010) recomendam que os DIV a serem reutilizados devam ser lavados com água, escovados para retirada de detritos e desinfetados com solução de amônia quaternária. Apesar de ser uma estratégia válida e sem prejuízos à taxa de prenhez (Sá Filho et

al., 2009; Crepaldi et al., 2009), a má higienização e o armazenamento dos DIV reutilizados podem favorecer o aumento das reações inflamatórias e, em casos mais graves, as vaginites.

Outra desvantagem da utilização dos DIV é a sua própria implantação no interior do canal vaginal da fêmea. Para isso, a fêmea deve estar contida e faz-se necessária a utilização de um aplicador de plástico, no qual o DIV é acoplado. Este aplicador é introduzido no canal vaginal da fêmea, o êmbolo do aplicador é pressionado e então, o DIV é mantido no canal vaginal (Senger, 2003).

2.7. Protocolos de IATF alternativos que dispensam o uso dos DIV

Pursley et al. (1995) desenvolveram um protocolo para a sincronização do estro e da ovulação de vacas leiteiras que dispensa o uso dos DIV, denominado Ovsynch. Este protocolo é baseado na aplicação de duas injeções de GnRH; uma realizada no D0 (dia zero) do protocolo e outra no D9 (dia nove) intercaladas por uma injeção de PGF₂ α no D7 (dia sete). A inseminação artificial ocorre 24 horas após a segunda injeção de GnRH. Este protocolo trouxe bons resultados aos programas reprodutivos utilizados em vacas leiteiras, porém sua efetividade em vacas Nelore é limitada devido ao alto índice de anestro que estes animais apresentam, principalmente quando criados em condições tropicais, situação da maior parte do rebanho brasileiro (Baruselli et al., 2004).

Com o passar do tempo, várias adaptações do Ovsynch foram surgindo com a intenção de melhorar a efetividade deste protocolo (Souza et al., 2008; Wiltbank et al., 2015; Yousuf et al., 2016), porém, a maioria destinada a vacas leiteiras.

Tanto a resposta ovulatória, quanto o tamanho do corpo lúteo são influenciados pelo tamanho do folículo no momento das injeções de GnRH do Ovsynch. Outro ponto importante é que a baixa quantidade de progesterona circulante durante a realização do protocolo,

aumenta a possibilidade da ovulação de oócitos subfêrteis, semelhantes a oócitos envelhecidos (Sartori et al., 2002a).

Visando aumentar a concentração de progesterona circulante em vacas submetidas ao protocolo Ovsynch, Souza et al. (2008) realizaram um experimento comparando duas variações do Ovsynch: o (1) Presynch, que consiste em duas aplicações de $\text{PGF}_2\alpha$ com intervalo de 14 entre elas e a implementação do Ovsynch 12 dias após a segunda aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$; e o (2) Double-Ovsynch, que consiste em um protocolo Ovsynch convencional seguido por outro, sete dias após o término deste primeiro. Com estas variações, os autores induziram a formação de um novo CL acessório. A ação conjunta dos dois CL, promoveu o aumento dos níveis de progesterona circulantes no momento da injeção de $\text{PGF}_2\alpha$, o que proporcionou maior controle sobre a fase progesterônica do protocolo e diminuição da ocorrência de folículos persistentes com oócitos envelhecidos. Nesta pesquisa, a concentração de progesterona e a taxa de prenhez foram maiores nos animais tratados com o Double-Ovsynch quando comparado com os tratados com o Presynch, porém estes dois protocolos possuem sete e seis manejos, respectivamente, o que reduz sua aplicabilidade em outro tipo de criação que não seja o gado leiteiro.

Quando se utiliza uma pré-sincronização antes do Ovsynch, pode-se controlar com maior eficiência o dia do ciclo estral que o protocolo é iniciado e, segundo Bello et al. (2006), quando se inicia o Ovsynch no dia seis do ciclo estral, a resposta ovulatória e a luteólise induzida pelo GnRH e $\text{PGF}_2\alpha$, respectivamente, são melhoradas quando comparadas com animais, nos quais o Ovsynch foi iniciado em um dia aleatório do ciclo estral.

Outro obstáculo encontrado no Ovsynch é a regressão incompleta do corpo lúteo. Wiltbank et al. (2015) afirmaram que mesmo quando uma vaca ovula durante o primeiro tratamento com GnRH do Ovsynch, a regressão incompleta do corpo lúteo resultante desta ovulação afeta diretamente a fertilidade desta vaca. Desta forma, esses autores avaliaram a

eficiência de duas injeções de $\text{PGF}_2\alpha$ no D7 e no D8, no Ovsynch convencional e no Double Ovsynch em vacas primíparas e em múltiparas e observaram que duas injeções de $\text{PGF}_2\alpha$ aumentaram o percentual de vacas primíparas com regressão luteal completa quando comparadas àquelas da mesma categoria que receberam apenas um tratamento com $\text{PGF}_2\alpha$ (97,5% vs. 81,2%, respectivamente; $P = 0,001$). O mesmo foi observado em vacas múltiparas, em que uma injeção resultou na taxa de regressão luteal completa de 84,4% e duas injeções resultaram em 96,7% ($P = 0,006$). Desta forma, concluíram que independente da categoria à qual as vacas pertenciam, houve um acréscimo de cerca de 10% na taxa de regressão luteal completa ao se utilizar duas injeções de $\text{PGF}_2\alpha$ em detrimento de uma. Os autores consideraram como regressão luteal completa quando o nível de progesterona circulante se encontrava abaixo de 0,5 ng/mL até 56 h após a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ em vacas que apresentavam concentração sérica de progesterona acima de 2,0 ng/mL no dia da primeira injeção de $\text{PGF}_2\alpha$.

Além do Ovsynch, outro tipo de protocolo que dispensa o uso de DIV é aquele que utiliza implantes auriculares subcutâneos impregnados com progesterona sintética (norgestomet) conhecido como protocolo CRESTAR[®]. Este protocolo baseia-se na manutenção de um implante auricular de silicone que libera progesterona de forma homogênea e linear por nove dias associado à aplicação de 5 mg de valerato de estradiol por via intramuscular profunda (Almeida, 2006).

Com relação às taxas de concepção, o protocolo CRESTAR[®] não difere estatisticamente de outros protocolos que utilizam DIV associados a compostos estrogênicos (Baruselli et al., 2002). Porém, a inserção do implante é dificultada e estressante para o animal, fato que faz com que alguns profissionais não utilizem este tipo de protocolo com tanta frequência.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível identificar os mecanismos pelos quais a eCG age no ovário com relação ao crescimento folicular, à taxa de ovulação e à formação do corpo lúteo e, a partir destas informações comprovar a importância da eCG em programas que visem melhorar o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas com baixo escore corporal, daquelas que se encontram em anestro e daquelas criadas em condições tropicais, como é o caso da maior parte do rebanho brasileiro.

Ademais, também foi possível concluir que protocolos baseados na associação de estrógeno e progesterona que utilizam um DIV é eficiente em reestabelecer a ciclicidade de vacas Nelore em anestro, porém apresentam algumas desvantagens que podem ser eliminadas através do uso de protocolos que dispensam o uso dos DIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.B.; Bertan, C.M.; Rossa, L.A.F. et al. 2006. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou ao benzoato de estradiol em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.4, p.456-465.
- Aggarwal, B.B.; Papkoff, H. 1985. Plasma clearance and tissue uptake of native and desialyted equine gonadotropins. **Domestic Animal Endocrinology**, v.2, n.4, p.173-181.
- Baruselli, P.S.; Marques, M.O.; Reis, E.L. et al. 2003. 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 v.1 p.380.
- Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Marques, M.O. et al. 2004. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise retrospectiva). In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita. **Acta Scientia Veterinariae**, v.32, p.228.

- Baruselli, P.S.; Jacomini, J.O.; Sales, J.N.S. et al. 2008. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, v.3, p.146-167.
- Baruselli, P.S.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A. et al. 2009. Uso de la eCG em biotecnologias reproductivas em bovinos. In: VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina.
- Baruselli, P.S.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A. et al. 2013. Nuevos avances em protocolos de IATF em ganado *Bos indicus* y *Bos taurus*. In: XVI Congreso Latinoamericano de Buiatría, Quito, Ecuador.
- Bello, N.M.; Steibel, J.P.; Pursley, J.R. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3413-3424.
- Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Moreno, D. et al. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72.
- Bó, G.A.; Cutaia, L.; Peres, L.C. et al. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v.6, p.223–236.
- Bó, G.A. 2010. Tratamientos de sincronización de celos en bovinos utilizando progestágenos y estrógenos (Unidad nº4). p. 99-157 In: Especialidad en reproducción bovina: Sincronización de celos y inseminación artificial. **Instituto de Reproducción Animal Córdoba**. Paraje Pozo del Tigre - AR.
- Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Mapletoft, R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.137-142.

- Catchpole, H.R.; Cole, H.H.; Pearson, P.B. 1935. Studies on the rate of disappearance and fate of mare gonadotropic hormone following intravenous injection. **The American Journal of Physiology**, v.112, p.21-26.
- Chenault, J.R.; Boucher, K.J.; Dame, J.A. et al. 2003. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2039-2049.
- Colazo, M.G.; Kastelic, J.P.; Whittaker, P.R. et al. 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.25-34.
- Cole, H.H.; Hart, G.H. 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **The American Journal of Physiology**, v.83, p.57-68.
- Crepaldi, G.A. 2009. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.
- De Rensis, F. Gatiús-López, F. 2014. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.177-182.
- FDA - Food and Drug Administration. 1972. **Federal Register** (FR Doc. 72-10263 Filed 7-5-72), v.37 n.130.
- Ferreira, R.M.; Ayres, H.; Sales, J.N.S. et al. 2013. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.26-33.
- Gimenes, L.U.; Sá Filho, M.F.; Carvalho, N.A.T. et al. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852-858.

- Inskeep, E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal Animal Science**, v.82, p.E24-E39.
- Lunenfeld, B. 2004. Historical perspectives in gonadotropin therapy. **Human Reproduction Update**, v.10, p.453-467.
- Mansano, C.F.M.; Simon, H.M.; Mukai, L.S. et al. 2013. Efeitos de dois protocolos para sincronização do estro em fêmeas bovinas sobre a taxa de prenhez ao primeiro serviço. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.3, p.278-284.
- Marques, M.O.; Reis, E.L.; Campos Filho, E.P. et al. 2003. Efeitos da administração da eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: V Simpósio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina p.392.
- McNatty, K.P.; Heath, D.A.; Henderson, K.M. et al. 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.72, p.39-53.
- Mello, R.R.C.; Ferreira, J.E.; Mello, M.R.B. et al. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.3, p.129-134.
- Mestre, A.M.; Antczak, D.F.; Allen (Twink), W.R. 2011. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG). p. 1648 – 1664. In: **Equine Reproduction** 2nd edition, McKinnon, A.O., ed. Blackwell Publishing Ltd, Chichester, West Sussex, UK.
- Murphy, B.D.; Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrinology Reviews**, v.12 p.27-44.
- Murphy, B.D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v.9, p.223-230.

- Nascimento, E.F.; Santos, R.L. 1997. Patologias do cérvix, da vagina e da vulva. In: **Patologia da reprodução dos animais domésticos**, 2ª edição, ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - BR.
- Núñez-Oliveira, R.; De Castro, T.; García-Pintos, C. et al. 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.14, p.111-116.
- Oliveira, J.F.C.; Gonçalves, P.B.D.; Ferreira, F. et al. 2010. Controle sobre o GnRH durante o anestro pós-parto em bovinos. **Ciência Rural**, v.40, p.2623-2631.
- Pacala, N.; Corin, N.; Benesik, I.; et al. 2010. Stimulation of the reproductive function at cyclic cows by ovsynch and PRID/eCG. **Animal Science Biotechnology**, v.43, p.317-320.
- Penteado, L.; Ayres, H.; Madureira, E.H. et al. 2004. Efeito da eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita. **Acta Scientia Veterinariae**, v.32 p.223.
- Pursley, J.R.; Mee, M.O.; Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cow using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-923.
- Rigoglio, N.N.; Fátima, L.A.; Hanassaka, J.Y. et al. 2013. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v.79, p.673-679.
- Roche, J.F. 1976. Retention rate cows and heifers of intravaginal silastic coils impregnated with progesterone. **Journal Reproduction and Fertility**, v.46, p.253-255.
- Rostami, B.; Niasari-Naslaji, A.; Vojgani, M. et al. 2011. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.100-106.

- Sá Filho, O.G.; Meneghetti, M.; Peres, R.F.G et al. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218.
- Sá Filho, M.F.; Ayres, H.; Ferreira, R.M. et al. 2010a. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v.73, p.651-658.
- Sá Filho, M.F.; Crespilho, A.M.; Santos, J.E.P. et al. 2010b. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.23-30.
- Sá Filho, M.F.; Torres-Júnior, J.R.S.; Penteado, L. et al. 2010c. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.182-187.
- Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Girotto, R.W. et al. 2011. 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**, v.124, p.12-18.
- Sartori, R.; Sartor-Bergfelt, R.; Mertens, S.A. et al. 2002a. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2803-2812.
- Sartori, R.; Guardieiro, M.M. 2010. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39 p.422-432.
- Senger, P.L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd revised edition. Current Conceptions, Inc. Pullman, WA.

- Schams, D.; Menzer, C.; Schallenberger, E. et al. 1978. Some studies on pregnant mare serum gonadotropin and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: Sreenan JM (ed) Control of Reproduction in the Cow. Martinus Nijhoff, The Hague, p.122.
- Souza, A.H.; Ayres, H.; Ferreira, R.M. et al. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lacting dairy cows. **Theriogenology**, v.70, p.208-215.
- Souza, A.H.; Viechneski, S.; Lima, F.A. et al. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cow. **Theriogenology**, v.72, p.10-21.
- Stocco, D.M. 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, v.63, p.193-213.
- Tortorella, R.D.; Ferreira, R.; Santos, J.T. et al. 2013. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.79, p.1204-1209.
- Walsh, R.B.; LeBlanc, S.J.; Vernooy, E. et al. 2008. Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.72, p.43-49.
- Wiltbank, M.C.; Gumen, A.; Sartori, R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21-52.
- Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Cochrane, F. et al. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F_{2α} during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.8644-8654.

Yousuf, M.R.; Martins, J.P.N.; Ahmad, N. et al. 2016. Presynchronization of lactating dairy cows with $\text{PGF}_{2\alpha}$ and GnRH simultaneously, 7 days before Ovsynch have similar outcomes compared to G6G. **Theriogenology**, v.86, p.1607-1614.

CAPÍTULO I

RETORNO À CICLICIDADE OVARIANA E INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM VACAS NELORE UTILIZANDO eCG E GnRH

1. INTRODUÇÃO

O protocolo Ovsynch proposto por Pursley et al. (1995) foi amplamente utilizado em vacas leiteiras como ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva destes animais. Contudo, nos animais criados sob condições tropicais, principalmente os da raça Nelore, a alta incidência de anestro limita o uso do Ovsynch devido à baixa quantidade de LH armazenado na adenohipófise (Baruselli et al., 2008).

Esta característica fez com que protocolos baseados no uso de um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona associado a um composto estrogênico apresentassem maior eficácia nestes, uma vez que a progesterona é a responsável pelo aumento do armazenamento de LH na adenohipófise, permitindo a ovulação, mesmo em animais em anestro (Baruselli et al., 2004). Entretanto, este tipo de protocolo traz algumas desvantagens como o custo e a perda deste dispositivo; o aumento de reações inflamatórias no canal vaginal e, principalmente, a maior mão de obra durante a introdução no canal vaginal (Roche et al., 1976; Nascimento et al., 2008; Bó, 2010).

A partir da década de 1930 com a descoberta da gonadotrofina coriônica equina (Cole e Hart, 1930) e com o avanço das pesquisas, foi comprovado que esta glicoproteína tem capacidade de se ligar tanto a receptores de FSH quanto a receptores de LH (Murphy e Martinuk, 1991) e, desta maneira, estimular o crescimento de folículos médios e grandes (De Rensis et al., 2014). Seu uso em protocolos de IATF em vacas Nelore melhora as taxas de concepção em fêmeas com baixo escore de condição corporal (ECC), isto é, aquelas que

apresentam ECC entre 2 a 3 (escala de 1 a 5) (Baruselli et al., 2008). A maioria das pesquisas traz o uso da eCG em protocolos de IATF após a ocorrência do desvio folicular visando ao estímulo da eCG sobre o crescimento folicular final, o que resulta em uma maior taxa de ovulação (Sá Filho et al., 2010a; Sá Filho et al., 2010b; Sá Filho et al., 2010c; Nuñez Oliveira et al., 2014).

De acordo com a dose utilizada, a eCG administrada na ausência de folículo dominante pode causar o crescimento simultâneo de vários folículos e resultar em múltiplas ovulações (Duffy et al., 2004). De Rensis et al. (2014) revisaram que doses abaixo de 1.000 UI de eCG são insuficientes para causar múltiplas ovulações em vacas leiteiras, porém a dose exata incapaz de causar múltiplas ovulações em vacas Nelore quando a eCG é administrada na ausência de um folículo dominante ainda não foi estabelecida.

No presente estudo, objetivou-se desenvolver um protocolo baseado em eCG, GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$ que induza o retorno à ciclicidade de vacas Nelore em anestro. Para isso foram construídos dois experimentos. O experimento I teve como objetivos específicos determinar o intervalo de dias entre a aplicação da eCG e o momento de aquisição de capacidade ovulatória e determinar o percentual de vacas que ovularam em resposta à administração de GnRH. Já o experimento II teve como objetivos específicos determinar a taxa de ovulação após a primeira e após a segunda injeção de GnRH em vacas submetidas a um protocolo eCG-GnRH-PGF-GnRH.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos dois experimentos, a seleção das vacas em anestro foi realizada por meio de ultrassonografia transretal, utilizando aparelho de ultrassom (HS 1600, Honda Eletronics[®], Tóquio, Japão) acoplado a um transdutor linear transretal de 7,5 MHz (Honda Eletronics[®], Tóquio, Japão). Foram realizados dois exames ultrassonográficos com intervalo de 11 dias e as vacas que não apresentaram CL nos dois exames, foram selecionadas. No mesmo dia do segundo exame ultrassonográfico, deu-se início aos tratamentos.

Todos os procedimentos de manejo realizados, incluindo seleção dos animais, monitoramento ovariano e aplicação de hormônios, foram realizados com os animais devidamente contidos, um por vez, em tronco de contenção hidráulico, onde seu pescoço e membros posteriores foram imobilizados para garantir a segurança tanto do animal como dos colaboradores. Todas as injeções foram realizadas pela via intramuscular profunda, utilizando agulhas com dimensões de 40x1,2 mm (Solidor[®], Barueri, Brasil) e seringas de 3,0 e 5,0 mL (SR[®], Pedro Juan Caballero, Paraguai). A eCG (Novormon[®]; Zoetis, Campinas, Brasil) foi mantida refrigerada entre 4° C e 8° C durante sua utilização, seguindo as orientações do fabricante.

Em cada experimento, por meio do aparelho ultrassonográfico foi possível a obtenção de 255 imagens de cada ovário, que foram analisadas e, estruturas como corpos lúteos e os folículos antrais maiores que 3 mm foram mensurados e mapeados individualmente para cada vaca e anotados em uma ficha de avaliação de dinâmica folicular (FADF) (**Anexo**). Para a determinação do diâmetro médio destas estruturas, foram feitas duas mensurações transversais, utilizando um recurso de mensuração do próprio aparelho de ultrassom, e anotadas sobre suas respectivas estruturas. A ovulação foi definida pela não observação do folículo dominante e pelo surgimento de um corpo lúteo naquele ovário. Estes eventos indicaram que este animal apresentou uma resposta satisfatória à injeção de GnRH.

2.1. Experimento I

2.1.1. Animais

O estudo foi conduzido entre os meses de outubro e novembro de 2015 na Fazenda Macuco (latitude: 11°13'17,10"S; longitude: 55°17'54,64"O), localizada no município de Itaúba, Mato Grosso, Brasil. Todos animais utilizados no experimento foram retirados de um rebanho puro de origem (PO) da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Os animais foram mantidos em pasto constituído de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

Foram selecionadas 20 vacas em anestro, sendo 14 vacas multíparas com $69,21 \pm 13,13$ (média $\pm$ desvio padrão) meses de idade, ECC de $2,57 \pm 0,39$ (escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 obesa, de acordo com Ayres et al. (2009)), $412,86 \pm 48,10$ Kg de peso vivo e período de espera voluntária (PEV) de $119,43 \pm 45,76$; e seis primíparas, com $40,67 \pm 1,97$ meses de idade, ECC de $2,42 \pm 0,20$, $336,75 \pm 22,57$ Kg de peso vivo e PEV de $152,33 \pm 56,71$ dias.

A despeito do experimento ter sido realizado nos meses de outubro e novembro, o índice pluviométrico na região estava aumentando e como consequência a disponibilidade de forragem também aumentou. Embora não tenhamos pesado os animais ao final do experimento, houve um incremento visual no ECC destes animais.

2.1.2. Delineamento experimental

Os animais ($n = 20$) foram divididos uniformemente em três grupos de modo que influência de todas as características dos animais tais como PEV, idade, ECC e peso fosse nula aos tratamentos. Dessa forma, o grupo I e o grupo II foram composto por sete vacas cada, sendo cinco multíparas e duas primíparas. O grupo III (controle) foi composto por seis vacas, sendo que destas, quatro foram multíparas e duas primíparas.

2.1.3. Tratamentos

No Dia 0 do experimento, os animais do grupo I receberam uma injeção de 800 UI de eCG, por via intramuscular, enquanto os animais do grupo II, 400 UI. Os animais do grupo controle ($n = 6$) receberam 4 mL de solução salina, por via intramuscular. Assim que um folículo maior ou igual a 8 mm era detectado através do monitoramento ovariano, as vacas recebiam uma injeção de 10,5 µg de GnRH (Sincroforte[®]; Ouro Fino, Cravinhos, Brasil) com a intenção de induzir a ovulação deste folículo

2.1.4. Monitoramento Ovariano

Todos os folículos antrais maiores que 3 mm foram monitorados e mapeados uma vez por dia a partir da aplicação da eCG (D0) por meio de exame ultrassonográfico até o momento em que um folículo dominante fosse detectado e apresentasse diâmetro maior ou igual a 8 mm ou por até seis dias contados a partir da detecção da emergência de uma onda folicular. Após a administração de GnRH mais dois exames eram realizados, dois e oito dias após esta aplicação para identificação dos animais que ovularam através da detecção de um ou mais corpos lúteos.

2.1.5. Análise Estatística

Para determinar se o sucesso na ovulação era função da dosagem de eCG, construímos um modelo de GLM com distribuição binomial de erros no ambiente R (R Core Team 2016). Um nível de probabilidade de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

2.2. Experimento II

2.2.1. Animais

O estudo foi conduzido entre os meses de fevereiro e março de 2016 na Fazenda Santa Sé (latitude 11°13'57,50" S; longitude 61°03'52,46"O), localizada no município de Cacoal, Rondônia, Brasil. Todos animais utilizados durante o experimento foram retirados de um

rebanho comercial de corte da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e estavam inseridos na estação reprodutiva. Os animais foram mantidos em pasto constituído de *Panicum maximum* cv. Mombaça com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

Foram selecionadas 17 vacas primíparas e quatro multíparas com $44,33 \pm 7,45$ meses de idade e escore corporal entre 2 e 2,5 (escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 obesa, conforme Ayres et al., 2009).

2.2.2. Delineamento experimental

Neste experimento, as 21 vacas selecionadas constituíam um grupo único.

2.2.3. Tratamento

As vacas foram submetidas ao protocolo hormonal que teve início com a aplicação de 400 UI de eCG (Novormon[®]; Zoetis, Campinas, SP, Brasil) no Dia 0, seguida pela aplicação de 10,5 µg de GnRH (Sincroforte[®]; Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) no Dia 2. No Dia 8 os animais receberam 500 µg de PGF₂α (Sincrocio[®]; Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) e 48 horas após esta injeção, foram novamente aplicados 10,5 µg de GnRH.

2.2.4. Monitoramento Ovariano

As estruturas ovarianas foram monitoradas através de ultrassonografia transretal uma vez por dia, nos dias 0, 2, 4, 8, 10 e 14 do protocolo.

2.2.5. Análise Estatística

Para determinar se houve sucesso na ovulação construímos um modelo de GLM com distribuição binomial de erros no ambiente R (R Core Team 2016). Um nível de probabilidade de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento I

Das sete vacas que receberam 800 UI de eCG, todas apresentaram folículos ovulatórios ≥ 8 mm dois dias após a aplicação de eCG (D2). Das sete vacas que receberam 400 UI de eCG, cinco apresentaram folículos ovulatórios ≥ 8 mm também dois dias após a aplicação da eCG (D2) e duas levaram três dias para que o folículo ovulatório atingisse tal medida, portanto em D3. Dos seis animais do grupo controle, quatro animais apresentaram folículos ovulatórios ≥ 8 mm dois dias após a aplicação da solução salina (D2), uma apresentou quatro dias após (D4) e uma apresentou cinco dias (D5) após a aplicação de solução salina. O **gráfico 1** ilustra estes resultados.

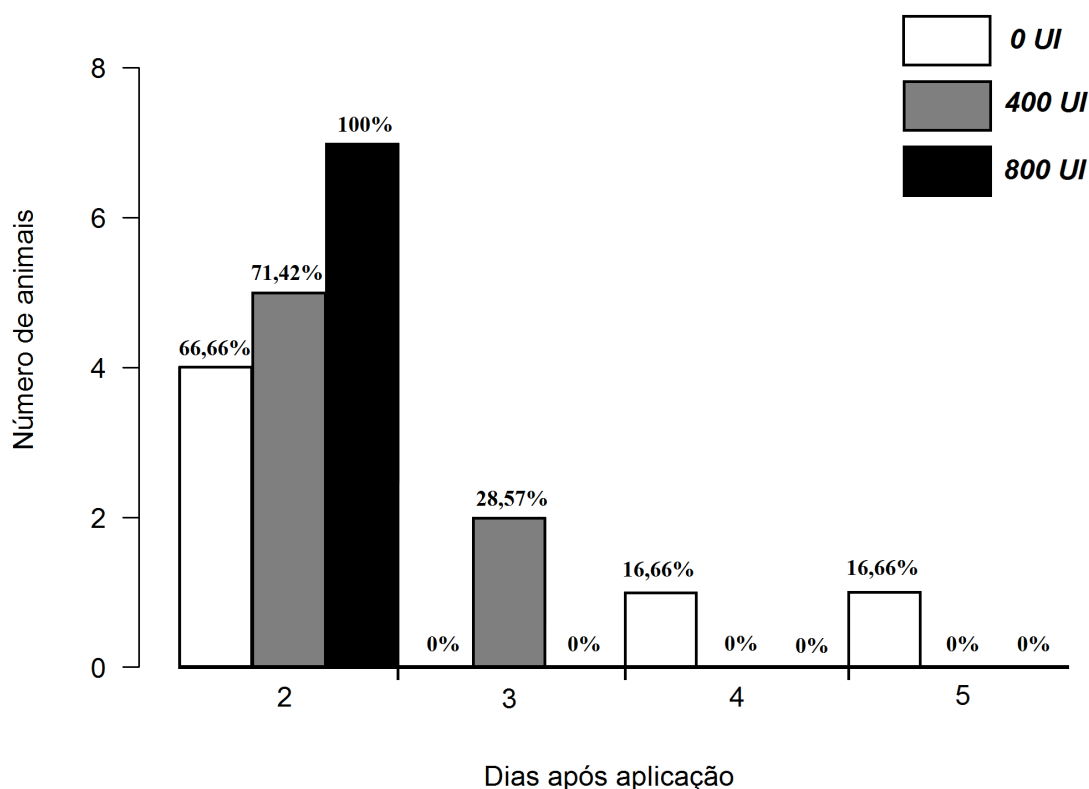


Gráfico 1 - Número de dias após a aplicação da eCG necessários para que os animais apresentassem folículo ovulatório com diâmetro ≥ 8 mm em função do tratamento realizado.

Considerando os dias em que os animais foram monitorados, o segundo dia após aplicação da eCG (D2) foi aquele no qual o maior percentual de vacas apresentou folículos

ovulatórios atingindo tamanho ≥ 8 mm (16/20). A partir desta informação estabeleceu-se que o segundo dia após a aplicação da eCG (D2) era o melhor dia para realizar a indução da ovulação nas vacas por meio do uso de GnRH.

A taxa de ovulação não variou em função da aplicação ou não da eCG (Binomial GLM: $\chi^2 = 13.38$, $P = 0,17$). Das sete vacas do grupo I (800 UI), todas ovularam; das sete vacas do grupo II (400 UI), seis ovularam e, das seis vacas do grupo controle (0 UI), quatro ovularam, porém, o corpo lúteo resultante da ovulação de uma destas vacas não foi detectado.

Os dados referentes ao percentual de ovulação estão apresentados no **gráfico 2**.

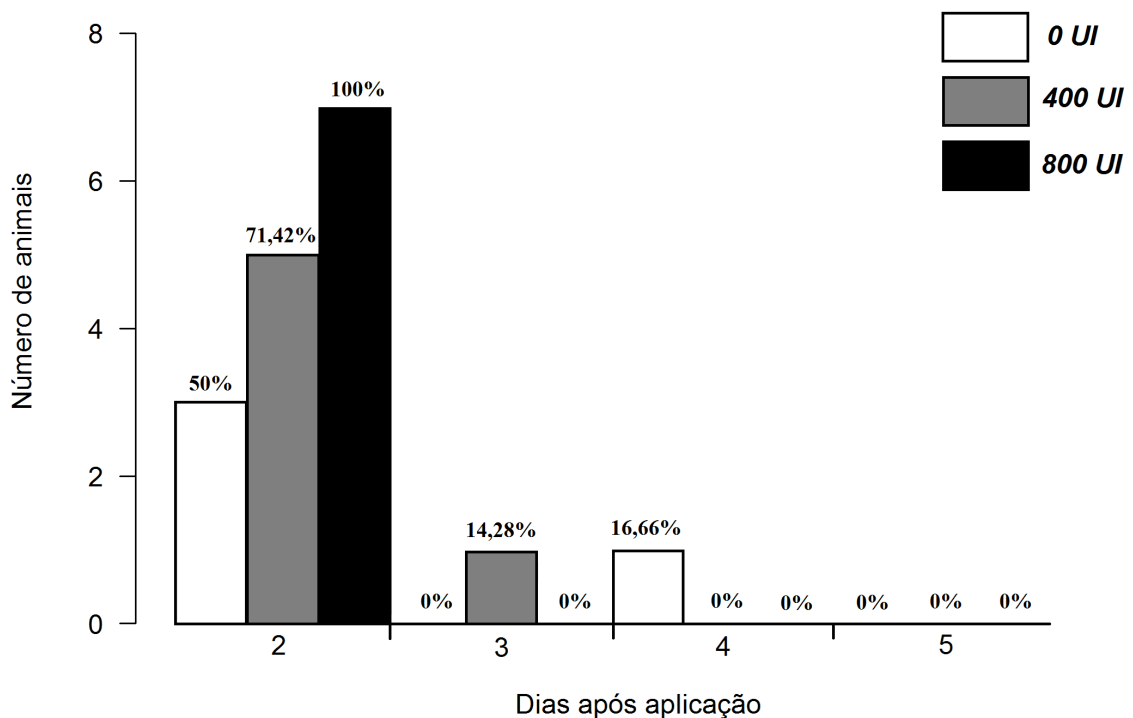


Gráfico 2 - Taxa de ovulação (%) em vacas Nelore em anestro do grupo controle, do grupo tratado com 400UI de eCG e do grupo tratado com 800 UI de eCG.

Apesar de todas as vacas do grupo I terem ovulado, a dose de 800 UI de eCG não demonstrou ser a mais adequada para ser utilizada em protocolos que não visam à

superovulação em vacas Nelore, visto que dos sete animais tratados com esta dose, três tiveram múltiplas ovulações. Já das seis vacas do grupo II que ovularam, apenas uma teve múltipla ovulação e, das quatro vacas que ovularam do grupo controle, nenhuma teve múltipla ovulação. Dessa forma, fica claro que a eCG estimula o crescimento folicular, suprimindo a condição de anestro, uma vez que permite que o folículo dominante atinja a capacidade ovulatória (≥ 8 mm) e permite o aumento da taxa de ovulação. Entretanto, altas doses deste fármaco podem causar a superovulação em animais em anestro.

3.2. Experimento II

A administração de 400 UI de eCG no D0 do experimento, seguida dois dias por uma aplicação de GnRH, resultou na ovulação de 15 das 21 vacas tratadas. Já após a segunda injeção de GnRH, apenas quatro vacas ovularam. Houve diferença entre os animais que ovularam em resposta à primeira injeção de GnRH quando comparados aos animais que ovularam em resposta à segunda (Binomial GLM: $\chi^2 = 45,58$, $P < 0,001$). Das quatro vacas que ovularam em resposta à segunda injeção de GnRH, uma não respondeu à primeira injeção.

Além do insucesso na ovulação após a segunda injeção de GnRH, cinco das 21 vacas utilizadas no experimento não apresentaram nenhuma resposta em relação ao tratamento, conforme demonstrado no **gráfico 3**.

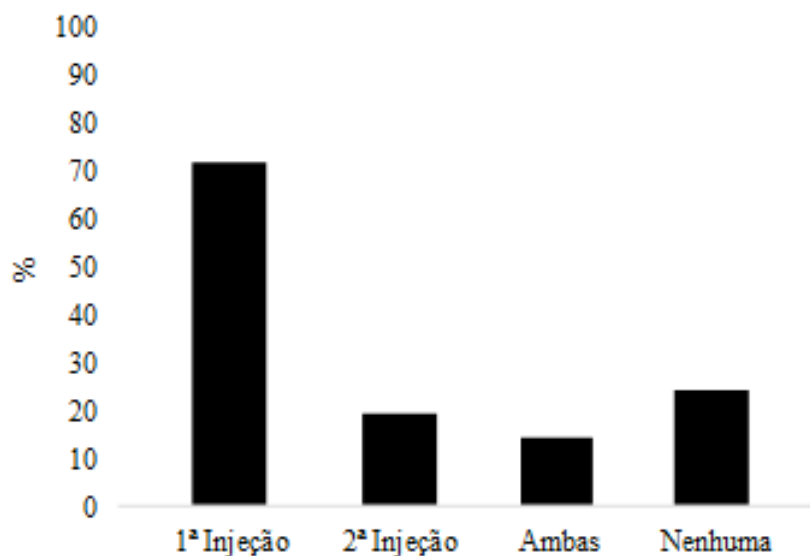


Gráfico 3: Distribuição das respostas apresentadas pelos animais (n = 21) tratados com o protocolo eCG, GnRH, PGF₂ α e GnRH em função da primeira e da segunda injeção de GnRH.

4. DISCUSSÃO

Por meio dos resultados obtidos no experimento I, observou-se que a eCG apresentou efetividade em induzir o crescimento folicular até a aquisição da capacidade ovulatória e, conseqüentemente, sincronizou as ovulações.

A eCG, quando administrada a outras espécies de mamíferos, que não a equina, apresenta atividade biológica tanto de FSH quanto de LH (Mestre et al., 2011), aumenta a taxa recrutamento de folículos menores que 5 mm, sustenta e estimula o crescimento de folículos médios e grandes (De Rensis et al., 2014). Estas características explicam o estímulo do crescimento folicular e o aumento na taxa de ovulação.

A dose de eCG necessária para causar uma única ovulação nos animais tratados varia entre 200 e 1000 UI (De Rensis et al., 2014). Contudo, mesmo que todas as vacas do grupo I (800 UI, Experimento I) tenham ovulado, essa dose demonstrou ser inadequada para este

protocolo ou para protocolos que não tem como objetivo estimular a superovulação em vacas Nelore, visto que três fêmeas apresentaram múltipla ovulação, podendo ser visualizados até 15 CL, oito dias após a aplicação de GnRH, em um dos animais.

Com relação às seis vacas pertencentes ao grupo II do Experimento I (400 UI) que ovularam, apenas uma teve dupla ovulação e, das quatro vacas que ovularam do grupo III (controle, Experimento I), nenhuma apresentou múltipla ovulação. Dessa forma, altas doses deste fármaco podem causar a superovulação, mesmo com uma única aplicação em vacas Nelore em anestro.

No experimento I, além da ocorrência de múltiplas ovulações no grupo I, uma vaca do grupo controle ovulou, porém, o corpo lúteo não foi visualizado dois e oito dias após a injeção de GnRH.

Pode-se afirmar que esta vaca ovulou, pois ela possuía um folículo pré-ovulatório no momento da aplicação do GnRH e dois dias após esta aplicação, este folículo não foi localizado durante o monitoramento ovariano e houve o recrutamento de uma nova onda folicular. Uma hipótese para tal evento é que o corpo lúteo não tenha tido aporte luteotrófico suficiente para sua manutenção, uma vez que estas vacas se encontravam em anestro e com ECC baixo. Isso também pode ser explicado pelo experimento conduzido por Randel (1984), em que o autor afirma que vacas *Bos indicus* em situações de baixa disponibilidade de forragem devido à sazonalidade, têm menos picos de LH, e que, em ensaios *in vitro*, o corpo lúteo destas vacas é menos responsivo ao LH, fato que justifica a não manutenção do corpo lúteo nestes casos.

O tempo de meia-vida de distribuição da eCG na vaca é de aproximadamente dois dias e o tempo de meia-vida de eliminação é de aproximadamente cinco dias (Murphy e Martinuk, 1991). Esta longa meia-vida de distribuição pode explicar o fato de que dois dias após a administração desta gonadotrofina, a maioria dos animais apresentava folículos ovulatórios.

Com os dados do experimento I, foi possível determinar que a emergência de uma nova onda folicular ocorreu de forma sincronizada dois dias após a administração da eCG. Embora a taxa ovulatória não tenha diferido entre os grupos, a resposta ovulatória no grupo controle não ocorreu de forma sincronizada, portanto a emergência de uma nova onda folicular também não foi sincronizada. Isto permitiu a administração de GnRH num dia pré-definido, isto é, dois dias após a aplicação da eCG, nos grupos tratados. A partir desta informação, foi possível delinear o experimento II sendo a aplicação de GnRH realizada dois dias após a eCG.

Com o experimento II pôde-se verificar que o protocolo utilizado foi eficiente em induzir o retorno à ciclicidade dos animais; foi capaz de induzir resposta ovulatória satisfatória após a primeira injeção de GnRH, porém não foi eficiente em induzir ovulação sincronizada após a segunda injeção de GnRH.

O uso do protocolo Ovsynch isolado apresenta resultados inconsistentes devido à fase do ciclo estral em que o protocolo é iniciado, falha na ovulação induzida pelo primeiro GnRH em decorrência da imaturidade do folículo dominante e falha na luteólise (Martins e Pursley, 2016). Em vacas Nelore, essa variabilidade de resposta pode ser ainda maior devido à grande proporção de animais que se encontram em anestro, característica dos animais criados de forma extensiva em regiões tropicais, sujeitos à variações sazonais de disponibilidade de alimento (Baruselli et al., 2004). Durante este período crítico, os animais consomem baixa quantidade de energia e/ou proteína na dieta, induzindo ao desencadeamento e à permanência da condição de anestro devido à ausência de pulsos de GnRH e, conseqüentemente, de secreção inadequada de gonadotrofinas (Senger, 2003).

Neste caso, como a eCG foi eficiente em induzir o crescimento folicular até a aquisição de capacidade ovulatória em vacas em anestro e a porcentagem de animais que respondeu à primeira injeção de GnRH foi superior àquela obtida com a segunda injeção

(71,43% vs. 19,05%, $P < 0,001$), nossa hipótese é que a falha na ovulação após a segunda injeção de GnRH se deu em decorrência da luteólise incompleta ou não efetiva do corpo lúteo resultante da ovulação da primeira injeção de GnRH, quer seja pela dose de cloprostenol utilizada (500 µg) ou pelo fato do intervalo entre a aplicação de GnRH e PGF₂α ter sido de seis dias.

A eCG é responsável pela formação de um folículo de diâmetro maior que dá origem a um CL de diâmetro maior e mais eficiente quanto à produção de progesterona, uma vez que se observa um maior número e maior diâmetro de células grandes luteais e maior volume mitocondrial por µm³ de corpo lúteo (Rigoglio et al., 2013). Sabe-se que as mitocôndrias são fundamentais para a produção de progesterona pelo corpo lúteo, pois é em seu interior e através de enzimas mitocondriais que o colesterol é convertido em pregnenolona (Senger, 2003). Destarte, um corpo lúteo maior e mais eficiente como o de animais submetidos a tratamentos com eCG pode carecer de mais eficiência na indução da luteólise.

Ainda neste contexto, pesquisas recentes têm demonstrado que duas aplicações de PGF₂α se mostraram mais eficientes em induzir a luteólise completa (Wiltbank et al., 2015; Yousuf et al., 2016). Com relação ao aumento da dose, Ferraz Júnior et al. (2016) verificaram que doses mais altas de PGF₂α natural (dinoprost; 25 e 50 mg) se mostraram mais eficientes em induzir a luteólise completa do que a dose convencionalmente utilizada (12,5 mg, $P < 0,01$). Portanto, as alternativas apresentadas acima, podem ser de grande importância a fim de aumentar a eficiência do nosso protocolo e serão alvo de estudos futuros.

O corpo lúteo não regride totalmente com uma única aplicação de PGF₂α antes do sexto dia (Nascimento et al., 2014) e também não regride totalmente, mesmo com uma segunda aplicação de PGF₂α no quinto dia do ciclo estral (Wiltbank et al., 2014). Essas informações referem-se à lise do corpo lúteo proveniente de uma ovulação em que o folículo ovulatório não foi estimulado com eCG.

Embora no presente trabalho o intervalo entre a aplicação de GnRH e de PGF₂ α tenha sido de seis dias, o corpo lúteo oriundo da ovulação induzida pelo GnRH foi proveniente de um folículo previamente estimulado por eCG. É sabido que a eCG induz o aumento no tamanho e a especificidade do CL (Rigoglio et al., 2013). Ademais, a eCG previne a luteólise prematura quando comparada àquela que ocorre em animais que não receberam eCG (Tortorella et al., 2013). Embora, não existam dados na literatura referentes à luteólise deste tipo de corpo lúteo, não podemos afirmar seguramente, que a luteólise de um corpo lúteo oriundo de um folículo previamente estimulado com eCG ocorra com a mesma facilidade que ocorre em um corpo lúteo decorrente de um ciclo normal, mesmo este corpo lúteo tendo seis dias. Assim, se os níveis de progesterona se mantiverem elevados, tem-se uma inibição do cio e do pico pré-ovulatório de LH necessário para a ovulação (Hafez e Hafez, 2004).

5. CONCLUSÃO

O protocolo baseado no uso de eCG, GnRH e PGF₂ α foi eficiente em estimular o retorno à ciclicidade de vacas Nelore em anestro, porém não foi eficiente em induzir a ovulação sincronizada dos animais após a segunda injeção de GnRH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayres, H.; Ferreira, R.M.; Souza, J.R. et al. 2009. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v.123, p.175-179.
- Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Marques, M.O. et al. 2004. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise retrospectiva). In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita. **Acta Scientia Veterinariae**, v.32, p.228.

- De Rensis, F.; Gatiús-López, F. 2014. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.177-182.
- Duffy, P.; Crowe, M.A.; Austin, E.J. et al. 2004. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v.61, p.725-734.
- Ferraz Junior, M.V.; Pires, A.V.; Biehl, M.V. et al. 2016. Luteolysis in *Bos indicus* cows on Days 5 and 7 of estrous cycle with varying doses of PGF₂ α . **Theriogenology**, article in press, p.1-7.
- Hafez, E.S.E.; Hafez, B. 2004. Reprodução Animal. Sétima edição. Monole. Barueri – SP.
- Martins, J.P.N. and Pursley, J.R. 2016. Programas de fertilidade para vacas de leite, suas bases fisiológicas e os fatores críticos para seu sucesso. p.160-167. In: Anais da XXX Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões, Foz do Iguaçu – PR.
- Mestre, A.M.; Antczak, D.F.; Allen (Twink), W.R. 2011. Equine Chorionic Gonadotropin (eCG). p. 1648 – 1664. In: **Equine Reproduction** 2nd edition, McKinnon, A.O., ed. Blackwell Publishing Ltd, Chichester, West Sussex, UK.
- Murphy, B.D.; Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrinology Reviews**, v.12, p.27-44.
- Nascimento, A.B.; Souza, A.H.; Keskin, A. et al. 2014. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF₂ α in nonlactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.81, p.389-395.
- Nuñez-Oliveira, R.; De Castro, T.; García-Pintos, C. et al. 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.14, p.111-116.

- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL, <https://www.R-project.org/>.
- Randel, R. D. 1984. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian Breeds). **Theriogenology**, v.21, n.1, p.170-185.
- Rigoglio, N.N.; Fátima, L.A.; Hanassaka, J.Y. et al. 2013. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v.79, p.673-679.
- Senger, P.L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd revised edition. Current Conceptions, Inc. Pullman, WA.
- Souza, A.H.; Ayres, H.; Ferreira, R.M. et al. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.70, p.208-215.
- Tortorella, R.D.; Ferreira, R.; Santos, J.T. et al. 2013. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.79, p.1204-1209.
- Vasconcelos, J.L.M.; Silcox, R.W.; Rosa, G.J.M. et al. 1999. Synchronization rate, size of the ovulation follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p.1067-1078.
- Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Vasconcelos, J.L.M. et al. 2014. The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v.11, p.225-236.

- Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Cochrane, F. et al. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.8644-8654.
- Yousuf, M.R.; Martins, J.P.N.; Ahmad, N. et al. 2016. Presynchronization of lactating dairy cows with $PGF_{2\alpha}$ and GnRH simultaneously, 7 days before Ovsynch have similar outcomes compared to G6G. **Theriogenology**, v.86, p.1607-1614.

ANEXO

Identificação do animal:

Data	OE	OD	Observação
	