



LUIZ AUGUSTO CAPELLARI LEITE DA SILVA

**PRÉ-SINCRONIZAÇÃO COM FOLÍCULO PERSISTENTE EM
PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO A
BASE DE GnRH EM VACAS DE LEITE EM LACTAÇÃO**

**LAVRAS – MG
2017**

LUIZ AUGUSTO CAPELLARI LEITE DA SILVA

**PRÉ-SINCRONIZAÇÃO COM FOLÍCULO PERSISTENTE EM PROTOCOLOS DE
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO A BASE DE GnRH EM VACAS DE LEITE EM
LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração em Ciências
Veterinárias, para a obtenção do
título de Mestre.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales
Orientador

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Luiz Augusto Capellari Leite da.

Pré-sincronização com folículo persistente em protocolos de
sincronização da ovulação a base de GnRH em vacas de leite em
lactação / Luiz Augusto Capellari Leite da Silva. - 2017.
48 p.

Orientador(a): José Nélio de Souza Sales.

Coorientador(a): João Bosco Barreto Filho, Flamarion Tenório
de Albuquerque.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. pré-sincronização. 2. IATF. 3. Ovsynch. I. Sales, José Nélio
de Souza. II. Filho, João Bosco Barreto. III. Albuquerque,
Flamarion Tenório de. IV. Título.

**PRÉ-SINCRONIZAÇÃO COM FOLÍCULO PERSISTENTE EM PROTOCOLOS DE
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO A BASE DE GnRH EM VACAS DE LEITE EM
LACTAÇÃO**

**PRE-SYNCHRONIZATION WITH PERSISTENT FOLLICLE IN
SYNCHRONIZATION OF OVULATION PROTOCOLS BASED ON GnRH IN
LACTATION DAIRY COWS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração em Ciências
Veterinárias, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 06 de março de 2017.

Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dr. Pedro Augusto Carvalho Pereira	FAA

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

**LAVRAS MG
2017**

A Paulo Sérgio, meu pai, que com sua simplicidade me ensinou os verdadeiros valores da vida, seu exemplo é o que me impulsiona a seguir.

A Adailza Aparecida, minha mãe, pelo vínculo sublime.

A Leryanne, pessoa com quem amo partilhar a vida, você proporciona o melhor de mim.

Aos meus filhos Pedro e Rafael, por me ensinarem a amar da forma mais pura.

As minhas irmãs pela amizade e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela paz, saúde, serenidade, por ter me guiado na escolha do curso de Medicina Veterinária e ter colocado tantas pessoas maravilhosas em meu caminho;

A toda minha família, em especial meus pais, Paulo Sérgio e Adailza Aparecida, por terem me dado a vida, apoio e amor incondicional e terem me proporcionado o melhor ambiente e as melhores condições para que eu concluísse este importante objetivo na minha vida. Vocês são o maior presente que Deus me deu, meus verdadeiros exemplos;

A mulher da minha vida, minha amada Leryanne, que de forma carinhosa me deu força e coragem, sendo minha companheira em todos os momentos. E aos meus filhos Pedro e Rafael que embora não tenham conhecimento disso iluminam e elevam os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos e a agir com mais sabedoria;

Ao Médico Veterinário Paulo Antônio Miranda Barros Júnior que muito me ajudou permitindo a realização desse trabalho na fazenda onde era o responsável, obrigado pelo companheirismo e por estar sempre disposto a cooperar com minha pesquisa;

Ao Professor José Nélio de Souza Sales pela orientação para a elaboração deste trabalho, pelas oportunidades e ensinamentos, bem como pelo exemplo de profissional;

Que Deus retribua a todos vocês tudo de bom que me proporcionaram.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a pré-sincronização utilizando dispositivo de progesterona para indução de folículo dominante persistente em protocolos de IATF que utilizam GnRH e prostaglandina como base em vacas leiteiras em lactação. Atualmente, existem protocolos de pré-sincronização para o protocolo Ovsynch que apresentam boa eficiência, porém são longos e de difícil implantação em fazendas de leite. Assim, é importante o desenvolvimento de protocolos de pré-sincronização mais curtos e com a mesma eficiência do principal protocolo a base de GnRH e prostaglandina (Double-Ovsynch) para vacas em lactação. Existem protocolos eficientes de sincronização da ovulação que utilizam progesterona e estradiol, porém devido a possível proibição de ésteres de estradiol para o uso em bovinos, esse estudo será uma importante alternativa no futuro, quando por ventura for proibido o uso de estradiol em vacas que produzem leite, pois é uma tendência internacional tal ação. Por fim, o artigo científico publicado terá alto impacto, pois poderá ser utilizado por qualquer fazenda de leite do mundo.

Palavras chave: GnRH, pré-sincronização, Ovsynch, progesterona, IATF

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the pre-synchronization using progesterone device for persistent dominant follicle induction in TAI protocols using GnRH and prostaglandin in lactating dairy cows. Currently, there are pre-synchronization protocols for the Ovsynch protocol that present high efficiency, but are long and difficult to fix on dairy farms. Thus, it is important to develop shorter pre-synchronization protocols and with the same efficiency of the main GnRH-based protocol and prostaglandin (Double-Ovsynch) for lactating cows. There are efficient ovulation synchronization protocols that use progesterone and estradiol, but due to a possible prohibition of estradiol esters for use in cattle, this study will be an important alternative in the future when by chance it is forbidden the use of estradiol in cows that produce milk, since is an international trend such action. Finally, the published scientific article will have a high impact, as it can be used by any milk farm in the world.

Key words: reproduction, bovine, Double-Ovsynch, TAI

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema dos protocolos experimentais Double-Ov e P₄-Ov..... 47
- Figura 2** – Efeito do protocolo de pré-sincronização, Double-Ov e P-Ov, na taxa de prenhez aos 30 e 60 dias e na perda embrionária em vacas leiteiras em lactação..... 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeito da pré-sincronização, Double-Ov e P₄-OV, sobre a dinâmica folicular de vacas leiteiras em lactação submetidas ao protocolo Ovsynch..... 44
- Tabela 2** – Efeito de interação da estação do ano (verão ou inverno) e grau de sangue (HPB ou GR) na taxa de concepção aos 30 e 60 dias pós IA e na perda gestacional..... 45
- Tabela 3** – Efeitos dos protocolos de pré-sincronização sob a concentração de P₄ circulante..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC	Akaike's An Information Criterion
BE	Benzoato de estradiol
CL	Corpo lúteo
D	Dia
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EPM	Erro padrão da média
E2	Estradiol
FD	Folículo dominante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
i.m.	Intra muscular
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
LH	Hormônio luteinizante
N	Número
P	Significância
PEV	Período de Espera Voluntário
P ₄	Progesterona
PGF _{2α}	Prostaglandina 2 _α
RIE	Radioimunoensaio
SAS	Statistical Analysis System
US	Ultrassom
V _s	<i>Versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
A	Alfa
Mm	Milímetro
Mg	Miligrama
µg	Micrograma
ml	Mililitro
MHz	Mega-hertz
Ng	Nanograma
±	Mais ou menos
>	Maior
<	Menor
®	Marca registrada

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Protocolos de sincronização da ovulação	16
2.2 Protocolos de pré-sincronização	17
2.3 Progesterona	19
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1.....	27
ARTIGO Novo método de pré-sincronização utilizando progesterona para induzir folículo persistente em protocolos de sincronização da ovulação a base de GnRH em vacas leiteiras em lactação	27
Materiais e métodos.....	32
<i>Exames ultrassonográficos.....</i>	<i>33</i>
<i>Coleta de sangue e dosagem hormonal de progesterona</i>	<i>34</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>34</i>
Resultados	35
<i>Resposta ovariana aos protocolos de pré-sincronização</i>	<i>35</i>
<i>Taxa de prenhez por IA nos diferentes protocolos de pré-sincronização</i>	<i>35</i>
Discussão.....	36
REFERÊNCIAS	40

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A eficiente multiplicação de animais superiores por uso de biotecnologias da reprodução pode proporcionar maior retorno econômico à agropecuária. Elevados índices reprodutivos associados ao melhoramento genético, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e lucratividade na pecuária. Programas de inseminação artificial (IA) após detecção de cio geram resultados satisfatórios em termos de taxa de concepção (Dransfield et al., 1998). No entanto, a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras de alta produção é prejudicada devido a redução da taxa de serviço e conseqüentemente da concepção associada frequentemente às dificuldades na detecção de cio (Washburn et al., 2002; Lopez et al., 2004).

Na atualidade, existe tecnologia para sincronizar o crescimento folicular e a ovulação em bovinos de leite (Pursley et al., 1995 e 1997). Com esse intuito, emprega-se uma seqüência de tratamentos (protocolos) que têm como finalidade sincronizar a ovulação para o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que dispensa a necessidade de detecção do cio, tornando mais prático o uso dessa biotecnologia (Tenhagen et al., 2004). Durante os últimos anos, a IATF vem possibilitando maior aplicação da IA em fazendas de leite, favorecendo o melhoramento genético dos rebanhos e aumentando a taxa de serviço (Wiltbank et al., 2011).

Existem três premissas para a manipulação hormonal da dinâmica folicular e luteínica em programas de sincronização da ovulação para IATF: 1) Sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular; 2) Controlar a duração da fase progesterônica, pelo uso de dispositivos de liberação de progesterona e de agentes luteolíticos [prostaglandina $F2_{\alpha}$ ($PGF2_{\alpha}$) e estrógenos]; 3) Induzir a ovulação sincronizada do folículo dominante ao final do tratamento (Pursley et al., 1997; Cartmill et al., 2001; Cerri et al., 2004; Santos et al., 2004). Os protocolos de IATF podem combinar hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandina $F2_{\alpha}$ (Pursley et al., 1995) ou ter como base progesterona (P_4) e estradiol (E_2) (Souza et al., 2009). Porém, em vacas leiteiras predominam os protocolos a base de GnRH devido a proibição do uso de ésteres de estradiol em alguns países. No Brasil, ainda é permitido o uso de ésteres de

estradiol, porém é possível que futuramente seja proibido o uso de tal hormônio em vacas de leite. Assim, estudos que aprimoram a utilização de protocolos com base no GnRH em vacas de leite são de suma importância.

O protocolo padrão a base de GnRH e PGF_{2α} utilizado é o *Ovsynch*. Esse protocolo consiste em dia aleatório do ciclo estral (D0) administrar a primeira dose de GnRH. Sete dias depois administra-se PGF_{2α} (D7) e 48 horas mais tarde, a segunda dose de GnRH. As vacas são inseminadas 16 horas após o segundo GnRH. Apesar de atender as três premissas da sincronização da ovulação, esse protocolo apresenta baixa eficiência de sincronização (64%; Vasconcelos et al, 1999) se administrado em animais em dia aleatório do ciclo estral.

Em estudo de Vasconcelos et al. (1999), a taxa de ovulação foi maior em vacas que receberam o primeiro GnRH do protocolo *Ovsynch* entre os dias 5 e 9 e 17 e 21 dias do ciclo estral. Além disso, houve maior taxa de ovulação ao segundo GnRH do protocolo *Ovsynch* quando os animais responderam ao primeiro GnRH (Vasconcelos et al., 1999). Ainda, verificou-se que vacas que não respondem ao primeiro GnRH apresentam maior período de dominância do folículo ovulatório (persistência folicular), o que compromete a qualidade do oócito e do desenvolvimento inicial do embrião (Cerri et al., 2009). Tais alterações na dinâmica folicular resultam em menor taxa de prenhez (Chebel et al., 2006). Assim, com o intuito de melhorar a resposta ao primeiro GnRH do protocolo *Ovsynch*, têm-se utilizado protocolos de pré-sincronização para aumentar a proporção de vacas no momento ideal do ciclo estral para apresentar folículos dominantes que respondem ao primeiro GnRH (Moreira et al., 2001; Bello et al., 2006; Souza et al., 2008). Dentre os protocolos de pré-sincronização, o duplo *Ovsynch* tem apresentado melhor resultado de sincronização, com taxa de ovulação ao primeiro GnRH em torno de 82% e taxa de prenhez de 49,7% (Souza et al., 2008). Porém, tal protocolo é muito longo (28 dias) e de difícil implementação na fazenda. Assim, ainda existe necessidade de desenvolvimento de protocolos de pré-sincronização que sejam mais práticos e curtos.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a pré-sincronização utilizando dispositivo de P₄ para indução de folículo dominante persistente em protocolos de IATF que utilizam GnRH e PGF_{2α} como base em vacas lactantes. Além de aumentar o número de folículos que respondem ao primeiro GnRH, a utilização de progesterona na pré-sincronização deverá permitir que os folículos da onda ovulatória cresçam em alta concentração de progesterona. Estudos anteriores verificaram que a qualidade do oócito da segunda onda de

crescimento é maior do que de folículos da primeira onda folicular, devido a maior concentração de progesterona no período de crescimento (Bisinotto 2010; Wiltbank 2011). O crescimento do folículo dominante em baixa concentração de progesterona altera a composição do líquido folicular (Cerri et al., 2008), aumenta a afinidade dos receptores ao estradiol e à ocitocina para liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, elevando o risco de ciclos curtos (Cerri et al., 2008).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Protocolos de sincronização da ovulação

A redução da fertilidade em vacas leiteiras é um problema multifatorial e muitas vezes associado com a alta produção de leite (Lucy, 2001; Santos et al., 2004) e baixas concentrações de progesterona circulantes (Wiltbank et al., 2006). Mudanças no desenvolvimento folicular causadas pelo metabolismo esteroidal afetam a fertilização e o desenvolvimento embrionário precoce contribuindo para a subfertilidade das vacas leiteiras (Cerri et al., 2011). Segundo Washburn et al. (2002) baixa expressão e falhas na detecção do estro são os principais fatores que levam a redução na fertilidade e interagem diretamente com a nutrição, problemas fisiológicos e de manejo dos animais. Entretanto, atualmente temos acesso aos protocolos de sincronização da ovulação que permitem a realização da IATF. Os programas de IATF são amplamente utilizados devido à capacidade de aumentar o número de fêmeas artificialmente inseminadas, sem que haja a necessidade de detecção de estro (Sá Filho et al., 2011). Os hormônios reprodutivos usados para fazer o controle do ciclo estral são idênticos ou análogos aos endógenos de origem hipotalâmica (GnRH), ovariana (E_2 e P_4) ou uterina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e exercem semelhante atividade biológica (Lucy et al., 2004).

O protocolo de sincronização da ovulação a base de GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$ é o mais utilizado em vacas leiteiras e realiza o controle da função luteínica e do desenvolvimento folicular (Azevedo et al., 2014). Tal protocolo foi proposto por Pursley et al. (1995) e consiste em um dia aleatório do ciclo estral (D0) administrar a primeira dose de GnRH. Sete dias depois administrar $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D7) e 48 horas mais tarde, a segunda dose de GnRH. As vacas são inseminadas 12 horas após o segundo GnRH. A primeira administração de GnRH tem como objetivo sincronizar a emergência da onda folicular por indução da ovulação, a administração

de $PGF2\alpha$ promove a regressão do tecido luteínico agindo como forma de controle da fase progesterônica e a segunda administração de GnRH induz a ovulação sincronizada do folículo dominante (Pursley et al., 1995). Outro programa comumente utilizado em gado de leite no Brasil associa benzoato de estradiol (BE) com P_4 . Nesse protocolo, administra-se BE com dispositivo de P_4 intravaginal para promover a atresia folicular e a emergência de uma nova onda folicular por *feedback* negativo no hipotálamo ao GnRH (Carvalho et al., 2008). Após esse primeiro passo, é necessário que se promova redução na concentração sérica de progesterona pela retirada do estímulo exógeno (remoção do dispositivo de progesterona) e endógeno (administração de prostaglandina para regressão do corpo lúteo) (Sales et al., 2012). Por fim, pode-se realizar suporte ao crescimento final do folículo dominante utilizando a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e sincronização da ovulação com ésteres de estradiol (Bó; Baruselli; Martínez, 2003).

2.2 Protocolos de pré-sincronização

A sincronização da ovulação não é um processo perfeito. Algumas vacas têm a sincronização da ovulação de forma adequada, enquanto outras não respondem satisfatoriamente aos protocolos (Lucy et al., 2004). A baixa sincronização da onda folicular está relacionada à resposta ovariana ao primeiro GnRH com ausência de efeito sobre a ovulação ou luteinização do folículo, o que modifica o estado de desenvolvimento do folículo dominante presente no momento da segunda administração de GnRH (Vasconcelos et al., 2001). Em vacas (Vasconcelos et al., 1999) e novilhas (Moreira et al., 2000) observou-se maior resposta a sincronização da ovulação e concepção, quando o protocolo *Ovsynch* foi realizado entre os dias 5 e 12 do ciclo estral. Tais autores relataram que quando se inicia a sincronização entre os dias 13 e 17 do ciclo pode ocorrer a regressão espontânea do corpo lúteo (CL) antes da administração de $PGF2\alpha$, e tais vacas não serão sincronizadas, pois deverão ovular antes da inseminação; e quando se inicia entre os dias 2 e 4 do ciclo estral, o folículo dominante recrutado não apresentará diâmetro suficiente para responder à administração de GnRH. Além disso, foi observado que folículos que possuem período de dominância superior a cinco dias são menos férteis (Austin et al., 1999) e folículos velhos podem falhar em responder com à injeção ovulatória do GnRH (Moreira et al., 2000). Tais experimentos demonstraram a necessidade do

desenvolvimento de sistemas de pré-sincronização a fim de aumentar a proporção de vacas no período ideal do ciclo estral para receber o primeiro GnRH do protocolo *Ovsynch*.

Diante dessa necessidade, Moreira et al. (2001) propuseram a realização da pré-sincronização com a administração de duas doses de PGF_{2α} com intervalo de 14 dias, seguido do *Ovsynch* 12 dias depois da segunda aplicação de PGF_{2α} chamado *Presync-Ovsynch*. A pré-sincronização nesse estudo aumentou em 12 pontos percentuais a taxa de concepção (37% vs 49%) em novilhas e El-Zarkouny et al. (2001) observaram aumento de 18% em vacas lactantes cíclicas (25% vs 43%;). Em outro estudo (Navanukraw et al., 2004), utilizando protocolo semelhante (12 dias de intervalo entre as administrações de PGF_{2α}) relataram taxa de concepção aos 42 dias de gestação de 49,6% para as vacas do grupo *Presync* e 37,3% nas vacas do grupo *Ovsynch*. Dessa forma, atribui-se a tais resultados favoráveis, o fato da pré-sincronização resultar em maior número de animais na fase ideal do ciclo estral para receber o protocolo *Ovsynch*. Entretanto, apenas vacas cíclicas podem se beneficiar do programa com duas PGF_{2α} uma vez que a resposta depende da presença de corpo lúteo responsivo (Chebel et al., 2006). Outra limitação da eficácia do protocolo *Presync-Ovsynch* seria a falta de precisão na sincronização folicular e nos estágios luteais, devido a variabilidade do estro e ovulação após tratamentos com PGF_{2α} (Ayres et al., 2013).

O sucesso do protocolo *Ovsynch* também depende da ciclicidade das vacas (Lucy et al., 2004). Apesar de o protocolo *Ovsynch* sincronizar bem vacas em anestro (Gumen et al., 2003), tais animais apresentam menor taxa de concepção (Moreira et al., 2001). Essa redução na fertilidade das vacas em anestro pode ser atribuída ao aumento na porcentagem de ciclos curtos após o *Ovsynch* (Gumen et al., 2003). Tais experimentos destacam a importância de utilizar estratégias de pré-sincronização para regular o momento de início do protocolo *Ovsynch* em vacas cíclicas e estimular a ciclicidade de vacas em anestro (Ayres et al., 2013).

Outra forma de realizar a pré-sincronização é realizar um protocolo *Ovsynch* como ferramenta de pré-sincronização (*Double-Ovsynch*; Souza et al., 2008). O *Double-Ovsynch* consiste em fazer o *Ovsynch* duas vezes com um intervalo de sete dias entre a segunda administração de GnRH do primeiro protocolo e a primeira administração de GnRH do *Ovsynch* da IATF. O *Double-Ovsynch* é capaz de controlar o dia do ciclo estral em que o *Ovsynch* é iniciado (Ayres et al., 2013). Dessa forma, aumenta a resposta ovariana ao tratamento hormonal e as concentrações de P₄ durante o *Ovsynch* da IATF (Souza et al., 2008). Souza et al. (2008)

observaram 28% a mais de vacas com alta P_4 (≥ 3 ng/mL) no momento da $PGF2\alpha$ no grupo *Double-Ovsynch* (78,1% vs 52,3%) quando comparado ao grupo tratado com duas $PGF2\alpha$. Em outro estudo, (Herlihy et al., 2012) observaram que com o tratamento *Double-Ovsynch* a porcentagem de vacas primíparas e multíparas com baixas concentrações circulantes de P_4 é menor quando comparadas com as fêmeas tratadas com o *Presync-Ovsynch* (3,3 vs 19,7% em primíparas; e 8,8 vs 31,9% em multíparas).

Vacas com baixas concentrações de P_4 no momento da administração de $PGF2\alpha$ apresentam maior probabilidade de luteólise prematura, com consequente pico de hormônio luteinizante (LH) e ovulação antes da administração do segundo GnRH do *Ovsynch* (Vasconcelos et al., 1999). Em ambos os estudos (Souza et al., 2008 e Herlihy et al., 2012), o protocolo *Double-Ovsynch* aumentou a fertilidade do *Ovsynch* comparado ao *Presync-Ovsynch*. A resposta ovulatória ao primeiro GnRH do *Ovsynch* aumenta as concentrações circulantes de progesterona e permite o desenvolvimento do folículo dominante menos variável e mais próximo do tamanho ideal no momento do segundo GnRH (Bello et al., 2006; Giordano et al., 2012). Maiores concentrações circulantes de P_4 durante o desenvolvimento folicular podem diminuir a pulsatilidade de LH, possivelmente aumentar a competência do folículo dominante, a qualidade do oócito e do ambiente uterino (Mihm et al., 1994 e Revah et al., 1996). Outros estudos também relacionaram a ovulação ao primeiro GnRH do *Ovsynch* e a presença de CL no momento da $PGF2\alpha$ com maiores taxas de prenhez aos 30 e 60 dias pós inseminação artificial (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2001; Cerri et al., 2004 e Chebel et al., 2006).

2.3 Progesterona

O uso de dispositivos intravaginais contendo P_4 foi inicialmente proposto por Carrick e Shelton (1967) e Scanlon et al. (1972) para sincronização do estro e da ovulação. Seu uso tem sido recomendado em protocolos de IATF, particularmente em vacas em anestro para promover o retorno à ciclicidade no pós-parto (Chebel et al., 2006) e aumentar as taxas de concepção (Stevenson et al., 2006). A P_4 exerce papel fundamental no folículo, embrião e desenvolvimento fetal e pode afetar a qualidade oocitária pelos efeitos no desenvolvimento do folículo dominante (Mann et al., 2003).

A frequência da secreção pulsátil de GnRH é regulada pelas concentrações circulantes de P₄ durante o ciclo estral, o que por sua vez regula a frequência da pulsatilidade de LH (Kinder et al., 1996). A frequência pulsátil do LH é fator primário na determinação da ovulação do folículo dominante (Chebel et al., 2006). Concentrações sub-luteais de P₄ estão associadas com aumento na frequência dos pulsos de LH (Roberson et al., 1989). O aumento de frequência de pulsos de LH não permite que seja atingido o padrão de frequência necessária para maturação final do folículo ovulatório ou para ocorrer a ovulação (Adams et al., 1992). Tal aumento da disponibilidade de LH também tem sido associado com a aceleração da maturação oocitária, marcada pelo retorno precoce da meiose (6 dias após a emergência da nova onda) (Inskeep et al., 2004), reduzindo a qualidade do embrião e levando ao rompimento da vesícula germinativa (Revah and Butler, 1996).

Entretanto, altas concentrações de P₄ durante o ciclo estral precedente à inseminação têm sido associadas com melhores resultados de concepção (Fonseca et al., 1983) pela redução na incidência de ciclos curtos após a inseminação (Silvia et al., 1991). A inseminação de vacas leiteiras com ovulação induzida do folículo dominante da primeira onda folicular resultou em resultados de fertilidade inferiores aos folículos da segunda onda folicular (Bisinotto et al., 2010). Tal diferença pode ser atribuída às concentrações reduzidas de P₄ durante o crescimento do folículo ovulatório da primeira onda folicular, uma vez que se obteve semelhança nos resultados de vacas que foram suplementadas com progesterona exógena e ovularam o folículo da primeira onda e de vacas induzidas a ovular o folículo da segunda onda folicular (Denicol et al., 2012).

A prevalência de vacas em anestro ao final do período de espera voluntário (PEV) é importante fator que afeta a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros (Santos et al., 2004). Estudos indicam que 20 a 40% das vacas no primeiro protocolo de sincronização pós-parto estão em anestro (Moreira et al., 2001; Lima et al., 2009). Vacas em anestro possuem baixas taxas de concepção após a primeira inseminação (Lima et al., 2009) e maior perda embrionária (Santos et al., 2004; Stevenson et al., 2006), tais vacas mantêm desenvolvimento contínuo dos folículos até tamanhos variáveis, no entanto, são incapazes de atingirem a ovulação, devido à secreção de estradiol pelos folículos ser insuficiente para provocar o efeito de *feed-back* positivo no GnRH ou devido à falta de resposta hipotalâmica ao E₂ por ausência de receptores específicos (Schillo, 1992). A exposição à P₄ por período de 5 a 9 dias pode induzir ciclicidade

em vacas em anestro (Rhodes et al., 2003). A P₄ promove ciclicidade em vacas em anestro pelo aumento no número de receptores de estrógenos no hipotálamo médio basal, o que reestabelece a resposta hipotalâmica resultando no aumento da liberação de LH e na capacidade de ovular (Gumen e Wiltbank, 2005).

Apesar do tratamento com P₄ exógena em vacas em anestro possibilitar o retorno da ciclicidade e redução na incidência de ciclos curtos após a ovulação (Chebel et al., 2006), as concentrações de P₄ alcançadas com o uso de um dispositivo intravaginal P₄ são subluteais (Cerri et al., 2009). Tal condição explica a ausência de melhora nos resultados de fertilidade observados em alguns experimentos com suplementação de P₄ (Bisinotto et al., 2013).

Resultados satisfatórios utilizando o protocolo *Ovsynch* em vacas leiteiras em lactação tem sido associado com a resposta ovulatória ao primeiro GnRH e com a presença de CL funcional no momento da administração de PGF_{2α} (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2001; Bisinotto et al., 2010). A ausência de CL funcional em vacas no início do protocolo de sincronização reduz em 30% a probabilidade de concepção após inseminação (Bisinotto et al., 2010). A baixa concentração de progesterona circulante em vacas que não possuem CL no início do protocolo de sincronização afeta a morfologia endometrial uterina (Shaham-Albalancy et al., 1997). Tal condição interfere na função secretora do endométrio durante o início da gestação e aumenta a síntese de PGF_{2α} em resposta a ocitocina (Shaham-Albalancy et al., 2001) resultando em curto tempo de vida útil do CL e perda gestacional (Cerri et al., 2011). Tais estudos indicam que as altas concentrações de P₄ durante o desenvolvimento do folículo ovulatório são críticas para alcançar alta fertilidade em vacas de leite.

A suplementação com P₄ exógena em vacas com ausência de CL funcional no início do protocolo *Ovsynch* resultou em concepção semelhante à de vacas que iniciaram o *Ovsynch* no diestro (Denicol et al., 2012). Um programa alternativo poderia ser a pré-sincronização do ciclo estral de forma a aumentar a proporção de vacas em diestro no início do protocolo de sincronização, ou aumentar a proporção de vacas que respondam ao primeiro GnRH e suplementar com P₄ exógena durante o crescimento do folículo ovulatório (Bisinotto et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 96, n. 2, p. 627-640, 1992.
- AUSTIN, E. J. et al. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of animal science**, v. 77, n. 8, p. 2219-2226, 1999.
- AYRES, H. et al. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 159-164, 2013.
- AZEVEDO, C. et al. O protocolo hormonal ovsynch e suas modificações em vacas leiteiras de alta produção: uma revisão. **Arquivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 173-187, 2014.
- BELLO, NM; STEIBEL, J. P.; PURSLEY, J. R. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3413-3424, 2006.
- BISINOTTO, R. S. et al. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2214-2225, 2013.
- BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3578-3587, 2010.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, out. 2003.
- CARRICK, M. J.; SHELTON, J. N. The synchronization of oestrus in cattle with progestagen-impregnated intravaginal sponges. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 14, n. 1, p. 21-32, 1967.
- CARTMILL JA, EL-ZARKOUNY SZ, HENSLEY BA, ROZELL TG, SMITH JF, STEVENSON JS An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 4, p. 799-806, 2001.
- CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-75, 2008.

CERRI RLA, RIVERA F, NARCISO CD, OLIVEIRA RA, CHEBEL RC, AMSTALDEN MA, THATCHER WW, SANTOS JEP. Progesterone concentration during follicular development affects follicular fluid composition and uterine release of PGF2a in dairy cows. **Journal of Dairy Science** (abstr.) p. 91:245, 2008

CERRI RLA, SANTOS JE, JUCHEM SO, GALVÃO KN, CHEBEL RC. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3704-3715, 2004.

CERRI, R. L. A. et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3352-3365, 2011.

CERRI, R.L.A., H.M. RUTIGLIANO, R.G.S. BRUNO, AND J.E.P. SANTOS. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1, p. 56-70, 2009.

CHEBEL, R. C. et al. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4205-4219, 2006.

DENICOL, A. C. et al. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1794-1806, 2012.

DRANSFIELD MB, NEBEL RL, PEARSON RE, WARNICK LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 1874-1882, 1998.

EL-ZARKOUNY, S. Z. et al. Presynchronization of estrous cycles in lactating dairy cows with Ovsynch + CIDR and resynchronization of repeat estrus using the CIDR. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. Suppl 1, p. 249, 2001.

FONSECA, F. A. et al. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 5, p. 1128-1147, 1983.

GIORDANO, J. O. et al. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 639-653, 2012.

GÜMEN, A.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 10, p. 3184-3194, 2003.

GÜMEN, A.; WILTBANK, M. C. Length of progesterone exposure needed to resolve large follicle anovular condition in dairy cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 202-218, 2005.

HERLIHY, M. M. et al. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7003-7014, 2012.

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13_suppl, p. E24-E39, 2004.

KINDER, J. E. et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

LIMA, J. R. et al. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5436-5446, 2009.

LOPEZ H, SATTER LD, WILTBANK MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3, p. 209-223, 2004.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001.

LUCY, M. C.; MCDUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 495-512, 2004.

MANN, G. E. et al. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1, p. 71-79, 2003.

MIHM, M. et al. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 1, p. 123-130, 1994.

MOREIRA, F. et al. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.

MOREIRA, F., C. ORLANDI, C.A. RISCO, R. MATTOS, F. LOPES, THATCHER W.W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1646-1659, 2001.

NAVANUKRAW, C. et al. A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 5, p. 1551-1557, 2004.

PURSLEY RJ, MEE MO, WILTBANK MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, Michael R.; WILTBANK, Milo C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 1, p. 39-47, 1996.

RHODES, F. M. et al. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1876-1894, 2003.

ROBERSON, M. S. et al. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 6, p. 997-1003, 1989.

SÁ FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3, p. 132-139, 2011.

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**, v. 78, n. 3, p. 510–6, ago. 2012.

SANTOS, J.E., W.W. THATCHER, R.C. CHEBEL, R.L.A. CERRI, AND K.N. GALVÃO. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 513-535, 2004.

SCANLON, P. F.; SREENAN, J.; GORDON, I. Synchronisation of oestrus in heifers by intravaginal application of progesterone. **Veterinary Record**, v. 90, n. 16, p. 440-441, 1972.

SCHILLO, Keith K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1271-1282, 1992.

SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF (2 α) secretion in the subsequent oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 643-648, 2001.

SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2, p. 159-174, 1997.

SILVIA, W. J. et al. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 5, p. 655-663, 1991.

SOUZA, A.H., H. AYRES, R.M. FERREIRA, AND M.C. WILTBANK. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

SOUZA, A.H., VIECHNIESKI, S., LIMA, F.A., SILVA, F.F., ARAÚJO, R., BÓ, G.A., WILTBANK, M.C., BARUSELLI, P.S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

STEVENSON, J. S. et al. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2567-2578, 2006.

TENHAGEN BA, DRILLICH M, SURHOLT R, HEUWIESER W. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 85-94, 2004.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

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 the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

WASHBURN S. P. et al. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 244-251, 2002.

WILTBANK, Milo et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, Milo C. et al. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

ARTIGO Novo método de pré-sincronização utilizando progesterona para induzir folículo persistente em protocolos de sincronização da ovulação a base de GnRH em vacas leiteiras em lactação

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a pré-sincronização utilizando dispositivo de progesterona para indução de folículo dominante persistente em protocolos de IATF que utilizam GnRH e prostaglandina como base em vacas leiteiras em lactação. No experimento, 440 vacas leiteiras (345 girolandas e 95 Holandesas) foram distribuídas aleatoriamente em um de dois grupos: (I) Double-Ov (n=228), administração i.m. de GnRH (D-17), PGF_{2α} 7 dias depois (D-10) e GnRH 3 dias mais tarde (D-7) seguido pelo protocolo Ovsynch 7 dias depois (GnRH no D0, PGF no D7, GnRH no D9); (II) P₄-Ov (n=212), implantação D-10 de dispositivo intravaginal de progesterona, 10 dias depois (D0) iniciou-se o protocolo Ovsynch, sendo a retirada do dispositivo feita no D7. Todas as vacas foram inseminadas 16 horas após a segunda dose de GnRH do protocolo Ovsynch e submetidas à exames ultrassonográficos para diagnóstico de gestação aos 30 e 60 dias pós IA. Em subgrupos de animais (n=102) realizou-se avaliações ultrassonográficas nos dias 0, 7, 9 e 24 do período experimental e coletas de sangue (n=44) nos dias 0, 7 e 24 para dosagem de progesterona. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis taxa de pré-sincronização [presença de folículo com mais de 12mm no D0, Double-Ov 94,2% (49/52) e P₄-Ov 92,0% (46/50); P=0,66], diâmetro folicular no 1º GnRH (Double-Ov 17,2 ± 0,7mm e P₄-Ov 18,6 ± 0,9mm; P=0,28), taxa de ovulação ao 1º GnRH [Double-Ov 86,3% (44/51) e P₄-Ov 81,2% (39/48); P=0,50], taxa de sincronização [Double-Ov 84,6% (44/52) e P₄-Ov 86,0% (43/50); P=0,84], diâmetro folicular no 2º GnRH (Double-Ov 17,5 ± 0,6mm e P₄-Ov 18,0 ± 0,5mm; P=0,48), taxa de ovulação no 2º GnRH [Double-Ov 90,9% (40/44) e P₄-Ov 86,0% (37/43); P=0,48] e diâmetro do CL no D24 (Double-Ov 27,9 ± 0,7mm e P₄-Ov 29,4 ± 0,9mm; P=0,19). Verificou-se diferença entre os tratamentos quanto à presença de CL no D0 [Double-Ov 57,7% (30/52) e P₄-Ov 36,0% (18/50); P=0,03]. Além disso, não houve diferença entre os grupos na taxa de prenhez aos 30 [Double-Ov 39,0% (89/228) e P₄-Ov 40,1% (85/212); P=0,85], 60 dias de gestação [Double-Ov 34,8% (79/227) e P₄-Ov 38,7% (82/212); P=0,41] e perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação [Double-Ov 7,9% (7/88) e P₄-Ov 3,5% (3/85); P=0,13]. Não houve diferença entre os grupos quanto à porcentagem de vacas com P₄ <1 ng/mL no D0 [Double-Ov 13,6% (3/22) vs P₄-Ov 5,0% (1/20); P=0,37] e quanto à porcentagem de vacas com P₄ >1 ng/mL no D7 [Double-Ov 77,3% (17/22) vs P₄-Ov 95,0% (19/20); P=0,14] e para concentração de P₄ no D24 (Double-Ov 4,7 ± 0,6 vs P₄-Ov 5,9 ± 0,9; P=0,84). Concluiu-se que a pré-sincronização com dispositivo de progesterona apresenta resultados semelhante ao protocolo Double Ovsynch no padrão de crescimento e regressão folicular e na fertilidade de vacas de leite em lactação.

Palavras chave: reprodução, bovinos, Double-Ovsynch, IATF

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the pre-synchronization using progesterone device for persistent dominant follicle induction in TAI protocols using GnRH and prostaglandin in lactating dairy cows. In the experiment, 440 dairy cows (345 girolando and 95 Holstein) were randomly assigned to one of two groups: (I) Double-Ov (n = 228), received i.m. GnRH (D-17), PGF 7 days later (D-10) and GnRH 3 days later (D-7) followed by the Ovsynch protocol (GnRH in D0, PGF in D7, GnRH in D9); (II) P₄-Ov (n = 212), D-10 implantation of intravaginal progesterone device, the Ovsynch protocol was initiated ten days later (D0), the device being withdrawn on D7. All cows were inseminated 16 hours after the second dose of GnRH from the Ovsynch protocol. Ultrasonographic evaluations (n = 102) were performed on days 0, 7, 9, 24, 30 and 60 of the experimental period and blood samples were collected (n = 44) on days 0, 7 and 24 for dosing progesterone. Statistical analysis was performed using the GLIMMIX SAS procedure. No differences were observed between the groups for the pre-synchronization variables [follicle presence > 12 mm in D0 [Double-Ov 94.2% (49/52) and P₄-Ov 92.0% (46/50); P = 0.66], follicular diameter at 1st GnRH (Double-Ov 17.2 ± 0.7 mm and P₄-Ov 18.6 ± 0.9 mm, P = 0.28), ovulation rate at 1^o GnRH [Double-Ov 86.3% (44/52) and P₄-Ov 81.25% (39/48); P = 0.50], synchronization rate [Double-Ov 84.6% (44/52) and P₄-Ov 86.% (43/50); P = 0.84], follicular diameter in the 2nd GnRH (Double-Ov 17.5 ± 0.6mm and P₄-Ov 18.0 ± 0.5mm, P = 0.48), ovulation rate in the 2nd GnRH [Double-Ov 90.9% (40/44) and P₄-Ov 86.0% (37/43); P = 0.48] and CL diameter in D24 (Double-Ov 27.9 ± 0.7mm and P₄-Ov 29.4 ± 0.9mm, P = 0.19). There was a difference between the treatments for the presence of CL in D0 [Double-Ov 57.7% (30/52) and P₄-Ov 36.0% (18/50); P = 0.03]. In addition, there was no difference between the groups in the pregnancy rate at 30 [Double-Ov 39.04% (89/228) and P₄-Ov 40.09% (85/212) (P = 0.85)], 60 days of gestation [Double-Ov 35.1% (80/228) and P₄-Ov 38.7% (82/212) (P = 0.37)] and gestational loss between 30 and 60 days of gestation [Double-Ov 7.9% (7/88) and P₄-Ov 3.5% (3/85); P = 0.13]. There were no differences between groups for the percentage of cows with P₄ <1 ng / mL at D0 [Double-Ov 13.6% (3/22) vs P₄-Ov 5.0% (1/20), P = 0.37) And for the percentage of cows with P₄ > 1 ng / mL in D7 [Double-Ov 77.3% (17/22) vs P₄-Ov 95.0% (19/20); P = 0.14] and for P₄ concentration in D24 (Double-Ov 4.7 ± 0.6 vs P₄-Ov 5.9 ± 0.9; P = 0.84). It was concluded that the pre-synchronization with progesterone

device presents results similar to the Double-Ovsynch protocol in the follicular dynamics and fertility of lactating dairy cows.

Key words: reproduction, bovine, Double-Ovsynch, TAI

Introdução

Na atualidade, existe tecnologia para sincronizar o crescimento folicular e a ovulação em bovinos leiteiros [1, 2]. Com esse intuito, emprega-se uma sequência de tratamentos (protocolos) que têm como finalidade sincronizar a ovulação para o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que dispensa a necessidade de detecção do cio, tornando mais prático o uso dessa biotecnologia [3]. Durante os últimos anos, a IATF vem possibilitando maior aplicação da IA em fazendas leiteiras, aumentando a taxa de serviço e favorecendo o melhoramento genético dos rebanhos [4].

Existem três premissas para a manipulação hormonal da dinâmica folicular e luteínica em programas de sincronização da ovulação para IATF, sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração da fase progesterônica pelo uso de agentes progestágenos e luteolíticos ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e estrógenos) e induzir a ovulação sincronizada do folículo dominante ao final do tratamento [2, 5, 6, 7]. Os protocolos de IATF podem combinar hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ [1] ou ter como base progesterona (P_4) e estradiol (E_2) [8]. Porém, em vacas de leite predominam os protocolos a base de GnRH devido a proibição do uso de ésteres de estradiol em alguns países. No Brasil, ainda é permitido o uso de ésteres de estradiol, porém é possível que futuramente seja proibido o uso de tal hormônio em vacas leiteiras. Assim, estudos que aprimoram a utilização de protocolos com base no GnRH em fêmeas bovinas são de suma importância.

O protocolo padrão a base de GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$ utilizado é o *Ovsynch*. Esse protocolo consiste em um dia aleatório do ciclo estral (D0) administrar a primeira dose de GnRH. Sete dias depois administra-se $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D7) e 48 horas mais tarde, a segunda dose de GnRH. As vacas são inseminadas 16 horas após o segundo GnRH. Apesar de atender as três premissas da sincronização da ovulação, esse protocolo apresenta baixa eficiência de sincronização [64%; (9)] quando administrado em dia aleatório do ciclo estral. A taxa de ovulação foi maior em vacas que receberam o primeiro GnRH do protocolo *Ovsynch* entre os dias 5 e 9 e 17 e 21 dias do ciclo estral e houve maior taxa de ovulação ao segundo GnRH do protocolo *Ovsynch* quando os animais responderam ao primeiro GnRH [9]. Ainda, verificou-se que vacas que não responderam ao primeiro GnRH apresentaram maior período de dominância do folículo ovulatório (persistência folicular) comprometendo a qualidade do oócito e do desenvolvimento

inicial do embrião [10]. Tais alterações na dinâmica folicular resultaram em menor taxa de prenhez [11].

Com o intuito de melhorar a resposta ao primeiro GnRH do protocolo *Ovsynch*, têm-se utilizado protocolos de pré-sincronização para aumentar a proporção de vacas no momento ideal do ciclo estral, que apresentem folículos dominantes responsivos ao primeiro GnRH [12, 13, 14]. Dentre os protocolos de pré-sincronização, o Double-Ovsynch tem apresentado melhor resultado de sincronização, com taxa de ovulação ao primeiro GnRH em torno de 82% e taxa de prenhez de 49,7% [14]. Porém, tal protocolo é muito longo (28 dias) e de difícil implantação nas fazendas. Assim, ainda existe necessidade de desenvolvimento de protocolos de pré-sincronização que sejam mais práticos e curtos.

O uso de dispositivos intravaginais de progesterona por período superior a 7 dias resulta em desenvolvimento de folículos maiores que o padrão natural e que persistem por mais tempo [15]. A persistência folicular ocorre devido a ausência de pico pré-ovulatório de LH pela presença dos dispositivos de P₄ que mantêm concentrações de P₄ superiores aos da fase folicular [16], o que deverá aumentar o número de folículos que respondem ao primeiro GnRH, e consequentemente a taxa de sincronização, além disso a utilização de P₄ na pré-sincronização deverá permitir que os folículos da onda ovulatória cresçam em alta concentração de P₄. Estudos anteriores verificaram que a qualidade do oócito da segunda onda de crescimento é maior do que de folículos da primeira onda folicular, devido a maior concentração de P₄ no período de crescimento [17, 4]. O crescimento do folículo dominante em baixa concentração de progesterona altera a composição do líquido folicular, aumenta a afinidade dos receptores ao estradiol e à ocitocina para liberação de PGF_{2α}, elevando o risco de ciclos curtos [18].

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a pré-sincronização utilizando dispositivo de P₄ para indução de folículo dominante persistente em protocolos de IATF que utilizam GnRH e PGF_{2α} em vacas de leite lactantes.

Materiais e métodos

Animais e local de realização do estudo

O presente estudo foi realizado de março de 2015 a agosto de 2016 em sete fazendas de leite do sudeste de Minas Gerais, Brasil. No experimento foram utilizadas 440 vacas leiteiras, sendo 345 girolandas (Holandês vs Gir Leiteiro) e 95 holandesas com produção média de leite de $24,8 \pm 0,4$; escore de condição corporal médio de $3 \pm 0,2$ [escala de 1 a 5, (19)] e período pós-parto de $30,5 \pm 0,5$ dias. As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia, mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha*, suplementadas com silagem de milho, concentrados proteicos e energéticos de forma balanceada e tiveram acesso *ad libitum* a água e suplementação mineral. Todos os procedimentos, incluindo injeções, coleta de sangue, IATF e exames ultrassonográficos do útero e ovários foram conduzidos em troncos de contenção apropriados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Lavras.

Delineamento experimental

Após a avaliação inicial, os animais selecionados foram divididos aleatoriamente em um de dois tratamentos. No grupo Double-Ov (n=228) as vacas foram submetidas ao protocolo *Double-Ovsynch*, conforme descrito por [14]. No grupo P4-Ov (n=212), as vacas receberam no D-10 um dispositivo de progesterona de 1g (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil). Dez dias depois (D0), foi administrado 100 µg GnRH (Diacetato de gonadorelina; Cystorelin, Merial Ltd., Duluth, GA) do protocolo *Ovsynch*. No D7, o dispositivo de progesterona foi removido e administrado 500µg de Cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil). Depois de 48 horas (D9), foi administrado 100 µg GnRH (Diacetato de gonadorelina; Cystorelin, Merial Ltd., Duluth, GA). Em todos os animais, a inseminação artificial foi realizada 16 horas após a segunda dose de GnRH (figura 1).

Exames ultrassonográficos

Em um subgrupo de animais (n=102) foram realizados exames ultrassonográficos (Mindray 4900, probe linear de 5MHz) para avaliar o diâmetro folicular no momento do primeiro (D0) e segundo GnRH (D9), a taxa de ovulação ao primeiro (D7) e ao segundo GnRH (D24) e o diâmetro do CL no D24. Além disso, em todos os animais foram realizados exames 30 e 60 dias após a IA para avaliar a taxa de concepção à IATF e a perda gestacional.

Coleta de sangue e dosagem hormonal de progesterona

Em um subgrupo (n=44) foram realizadas coletas de sangue no D0, D7 e D24 do período experimental por meio de punção da veia coccígea utilizando agulha estéril e tubos com vácuo contendo EDTA de 4 mL (Vacutainer, Becton-Dickinson e Company, EUA) para avaliar a concentração de progesterona durante o crescimento folicular e após a ovulação do protocolo *Ovsynch*. Após as coletas, o sangue foi mantido em isopor com gelo e conduzido ao laboratório. O plasma foi separado por centrifugação a 1000 g (Centrífuga Excelsa Baby, Fanem, Brasil) durante 20 minutos. O plasma separado foi acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) identificados e armazenados em freezer a -21°C até posterior análise. A análise da concentração de progesterona no plasma foi realizada pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se kits comerciais para determinação de progesterona com I₁₂₅ (MP Bio Diagnostics Progesterone RIA kit, MP Biomedicals) conforme descrito por [20]. As análises foram realizadas no laboratório de análises hormonais do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal- F.O.A. - UNESP, Araçatuba/SP.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistical Analysis System para Windows [21]. As variáveis contínuas foram submetidas à análise de diferentes distribuições de dados e foram utilizadas para verificar diferença entre os tratamentos, as análises que apresentaram o menor Akaike's An Information Criterion (AIC). Análise estatística foi realizada utilizando o procedimento GLIMMIX. Os dados binomiais foram avaliados por regressão logística multivariada utilizando o procedimento LOGISTIC do SAS. As variáveis foram removidas por eliminação retrógrada baseado no critério estatístico de Wald quando $P > 0,20$. A taxa de risco ajustada e o intervalo de confiança foram gerados durante a regressão logística. A taxa de prenhez à IATF aos 30 e 60 dias e a perda gestacional foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. O nível de significância para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi menor que 0,05, considerou-se efeito das variáveis classificatórias e das suas

interações. Os dados binomiais estão representados por porcentagem e as variáveis contínuas estão expressas em média e erro padrão da média (média \pm EPM).

Resultados

ECC, DEL e Produção de Leite

No presente estudo não houve diferença entre os grupos no momento da IATF quanto ao escore de condição corporal, (Double-Ov $2,9 \pm 0,02$ vs P4-Ov $2,9 \pm 0,02$; $P=0,69$), dias pós-parto (Double-Ov $57,2 \pm 0,66$ vs P4-Ov $57,8 \pm 0,81$; $P=0,77$) e produção de leite (Double-Ov $25,9 \pm 0,56$ vs P4-Ov $24,4 \pm 0,57$; $P=0,32$). Além disso, não houve interação entre as variáveis descritas com as taxas de prenhez aos 30 e 60 dias com a perda gestacional entre 30 e 60 dias ($P>0,05$).

Resposta ovariana aos protocolos de pré-sincronização

Na dinâmica folicular (tabela 1) não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto à taxa de pré-sincronização (presença de folículo > 12 mm no D0; $P=0,66$), diâmetro do folículo dominante no D0 ($P=0,28$), taxa de ovulação ao primeiro GnRH ($P=0,50$), taxa de persistência folicular após D0 ($P=0,20$), taxa de sincronização (presença de folículo > 12 mm no D9; $P=0,84$), diâmetro do folículo dominante no D9 ($P=0,48$), taxa de ovulação ao segundo GnRH ($P=0,58$) e diâmetro do CL pós IA (D24; $P=0,19$). No entanto, houve diferença entre os tratamentos quanto à presença de CL no D0 (Double-Ov 57,7% vs P4-Ov 36,0%; $P=0,03$).

Taxa de prenhez por IA nos diferentes protocolos de pré-sincronização

Não houve diferença entre os tratamentos na taxa de prenhez (figura 2) aos 30 [Double-Ov 39,0% (89/228) e P4-Ov 40,1% (85/212); $P=0,85$] e aos 60 dias de gestação [Double-Ov 34,8% (79/227) e P4-Ov 38,7% (82/212) ($P=0,41$)] e na perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação, Double-Ov 7,9% (7/88) e P4-Ov 3,5% (3/85; $P=0,13$).

Além disso, não houve interação entre prenhez aos 30 dias e estação do ano, 40,9% (114/279) no verão e 37,3% (60/161; $P=0,44$) no inverno ou entre prenhez aos 60 dias e estação do ano, 37,3% (104/279) no verão e 35,6% (57/160; $P=0,73$) no inverno; também não houve interação entre prenhez aos 30 dias e grau de sangue, 38,4% (133/346) para girolandas e 43,62% (41/94; $P=0,34$) para holandesas ou aos 60 dias 35,6% (123/345) para cruzadas e 40,4% (38/94; $P=0,39$) para holandesas. Da mesma forma não houve interação entre estação do ano e grau de sangue com a perda gestacional, verão 7,8% (9/114) e inverno 1,7% (1/59; $P=0,09$); girolandas 6,1% (8/132) e holandesas 4,9% (2/41; $P=0,75$) (tabela 2).

Concentrações de progesterona sérica

No estudo não houve diferença entre os tratamentos na concentração plasmática de progesterona nos dias 0, 7 e 24 do período experimental ($P>0,05$; tabela 3). O protocolo 4-Ov obteve eficiência semelhante ao Double-Ov em diminuir a porcentagem de vacas com baixa concentração de P4 ($<1\text{ng/ml}$) no D0 (Double-Ov 13,6% vs P4-Ov 5%; $P=0,37$) e em aumentar a porcentagem de vacas com concentração $>1\text{ng/ml}$ no D7 (Double-Ov 77,3% vs P4-Ov 95%; $P=0,14$).

Discussão

O presente estudo avaliou um novo protocolo de pré-sincronização com indução de folículo persistente para aumentar a resposta ao primeiro GnRH em protocolos *Ovsynch*, e consequentemente a eficiência desse protocolo. A hipótese inicial testada de que o protocolo de pré-sincronização P4-Ov apresentaria eficiência reprodutiva semelhante ao protocolo *Double-Ovsynch* foi aceita. No presente estudo, utilizou-se o protocolo *Double-Ovsynch* [14] como controle positivo devido à alta eficiência na sincronização e fertilidade de vacas holandesas lactantes no início do pós-parto. No entanto, tal protocolo é muito longo (28 dias) e exige grande quantidade de manejos das vacas (7 manejos) o que aumenta o risco de falhas na execução e o uso da mão de obra. É esperado que quanto mais complexo o protocolo maior as chances de erros, sendo esse um dos principais fatores que afetam o sucesso dos programas de sincronização. No presente estudo, os resultados encontrados para o P4-Ov foram semelhantes

aos observados no grupo Double-Ov, diferente de estudos anteriores em que o *Double-Ovsynch* se mostrou superior aos outros métodos de pré-sincronização [22, 23, 24].

A variabilidade nas taxas de sincronização é uma das principais limitações do protocolo *Ovsynch*, e pode ser atribuída à fase do ciclo estral em que o protocolo é iniciado, sendo a ausência de folículo ovulatório no primeiro GnRH e a persistência folicular, junto com a luteólise espontânea as principais causas de falha de sincronização [9]. A resposta ovulatória ao primeiro GnRH e a consequente emergência de uma nova onda folicular têm sido apontadas como os elementos críticos para a sincronização em protocolos de IATF [25].

As vacas do grupo P4-Ov apresentaram alta taxa de pré-sincronização (>90%) semelhante ao grupo Double-Ov. Além disso, a porcentagem de vacas com folículo que responderam à administração do primeiro GnRH foi maior do que 80% no protocolo P4-Ov, semelhante ao encontrado no grupo Double-Ov. Esses resultados são consistentes com o observado no *Double-Ovsynch* em que se verificou 71,8% de taxa de ovulação ao primeiro GnRH [14] e superiores aos observados em vacas pré-sincronizadas com prostaglandina (60 a 70%) [22, 23] ou sem pré-sincronização (50 a 70%) [1, 26]. O protocolo de pré-sincronização com progesterona foi efetivo em promover persistência folicular, pois a frequência da secreção pulsátil de GnRH e de LH é regulada pelas concentrações circulantes de P₄ [27] e a frequência pulsátil do LH é fator primário na determinação da ovulação do folículo dominante [11]. Concentrações sub-luteais de P₄ estão associadas com aumento na frequência dos pulsos de LH [28]. Porém, o aumento de frequência de pulsos de LH, sob efeito da P₄, não permite alcançar o padrão de frequência necessária para que ocorra a ovulação [29]. Dessa forma, o uso de dispositivos intravaginais de progesterona (cerca de 1 a 1,5g) resulta no desenvolvimento de folículos maiores que o padrão natural por maior período de tempo [15, 30, 31, 32] com padrão de secreção de LH similar ao da fase folicular do ciclo estral normal [33]. Tais características de desenvolvimento folicular e secreção de LH estimulam a formação de folículos persistentes [30]. Além disso, folículos persistentes possuem maior número de receptores de LH nas células da granulosa e teca [34], permitindo a manutenção da resposta ovulatória ao pico pré-ovulatório de LH [16]. Tais características foliculares permitiram que a administração do 1º GnRH do protocolo *Ovsynch* promovesse ovulação do folículo persistente com consequente formação de CL e elevação dos níveis séricos de P₄.

No grupo Double-Ov observou-se maior taxa de vacas com presença de CL no momento do primeiro GnRH. A presença de CL no início do protocolo *Ovsynch* está associada com maior eficiência na resposta ao protocolo e maior fertilidade [11]. Estudos têm demonstrado que vacas de leite no pós-parto recente apresentam taxas de 20 a 40% de anestro [12, 6, 35, 36]. Vacas em anestro apresentam menor taxa de prenhez/IA no primeiro serviço e maior perda embrionária [7]. Alguns autores associaram a reduzida fertilidade ao primeiro serviço com baixas concentrações de progesterona antes da primeira ovulação e inseminação [37] devido à maior incidência de ciclos curtos após a inseminação [10]. Em estudos anteriores [22, 14], observou-se redução do número de vacas anovulatórias após o tratamento com o *Double-Ovsynch*, sendo consistente com os resultados observados no presente estudo. Porém, a menor taxa de ciclicidade nas vacas do grupo P4-Ov no início do protocolo *Ovsynch*, não interferiu nas características foliculares e na fertilidade, devido essas vacas estarem com dispositivo intravaginal o que elevou a concentração de progesterona ao primeiro GnRH. No grupo P4-Ov verificou-se baixa porcentagem de vacas (5%) com progesterona abaixo de 1ng/mL na administração do primeiro GnRH e a concentração média de progesterona foi superior a 3ng/mL. Esses achados demonstram que o dispositivo de progesterona foi efetivo em manter altas concentrações de progesterona no início do protocolo *Ovsynch*. Valores semelhantes quanto à concentração de progesterona (2,65ng/mL no primeiro GnRH) foram encontrados em estudo anterior que avaliou o protocolo *Double-Ovsynch* [22]. A concentração de progesterona é importante no início do protocolo *Ovsynch*, visto que oócitos que crescem sob maior concentração de progesterona (folículo da segunda onda) apresentam melhor qualidade e conseqüentemente, maior fertilidade [17]. Maiores concentrações de progesterona durante o crescimento folicular diminuem a pulsatilidade de LH [32, 38], o que melhora a competência folicular e a qualidade oocitária e do embrião, como mostrado por [7, 16].

Nas vacas do grupo P4-Ov observou-se altas taxas (>85%) de sincronização (presença de FD no D9 que responde ao pico de LH) e ovulação ao segundo GnRH e baixa taxa de persistência após o primeiro GnRH (<15%), tais variáveis são importantes para sucesso de protocolos de sincronização que utilizam GnRH e prostaglandina. Em função disso, a taxa de prenhez das vacas do grupo P4-Ov (40%) foi satisfatória e semelhante ao protocolo Double-Ov (39%) e a perda gestacional entre 30 e 60 dias foi baixa (3,5%). Provavelmente, devido à alta taxa de sincronização alcançada no presente estudo também pudemos observar resultados

satisfatórios e semelhantes para os dois grupos na ovulação ao 2º GnRH (Double-Ov 90,9% vs P4-Ov 86,1%), consistente com o observado em outro estudo que utilizou o *Double-Ovsynch* [23] que obteve taxa de 98% de ovulação ao segundo GnRH do protocolo *Ovsynch*. No mesmo estudo observou-se diâmetro folicular de 16,0 mm no D9 do *Ovsynch* após a pré-sincronização com *Double-Ovsynch*, dados similares aos observados no presente estudo nas vacas do grupo, P4-Ov (18,0 mm) e Double-Ov (17,5 mm). Estudos têm demonstrado que vacas com folículo de 16 mm apresentam melhor fertilidade após a inseminação artificial [39].

Diante dos resultados apontados nas características foliculares, concentração de progesterona e fertilidade, conclui-se que o protocolo P4-Ov obteve eficiência semelhante ao protocolo *Double-Ovsynch* na sincronização folicular e taxa de concepção de vacas inseminadas por IATF utilizando o protocolo *Ovsynch*, sendo uma alternativa para aumentar a eficiência desse protocolo.

REFERÊNCIAS

- [1] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-923.
- [2] Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997; 80: 301-306.
- [3] Tenhagen BA, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci* 2004; 87: 85-94.
- [4] Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprodu Fertil Dev* 2011; 24: 238-243.
- [5] Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Rozell TG, Smith JF, Stevenson JS. An Alternative AI Breeding Protocol for Dairy Cows Exposed to Elevated Ambient Temperatures before or after Calving or Both. *J Dairy Sci* 2001; 84: 799-806.
- [6] Cerri RLA, Santos JEP, Juchem SO, Galvão KN, Chebel R. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3704-3715.
- [7] Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004; 82: 513-535.
- [8] Souza AH, et. al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 2009; 72: 10-21.
- [9] Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999; 52: 1067-1078.
- [10] Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno, R GS, Santos JEP. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim Reprod Sci* 2009; 110(1): 56-70.

- [11] Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci* 2006; 89: 4205-4219.
- [12] Moreira F, Orlandi, C, Risco C A, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1646-1659.
- [13] Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3413-3424.
- [14] Souza A H, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2008; 70: 208-215.
- [15] Lucy MC, Thatcher WW, Macmillan KL. Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology* 1990; 34: 325.
- [16] Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Bellows BA. Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biol Reprod* 1979; 21: 683.
- [17] Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JEP. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93: 3578-3587.
- [18] Cerri RLA, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Chebel RC, Amstalden MA, Thatcher WW, Santos JEP. Progesterone concentration during follicular development affects follicular fluid composition and uterine release of pgf2a in dairy cows. *J Dairy Sci* 2008; 91:245 (abstr).
- [19] Wildman EE et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci* 1982; 65: 495-501.
- [20] Colazo MG, Ambrose DJ, Kastelic JP, Small JA. Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Canad J Vet Res* 2008; 72: 32.
- [21] SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS user's guide: statistics. Versão 8.0. Cary: SAS, 2000.

- [22] Herlihy MM, et al. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2012; 95: 7003-7014.
- [23] Ayres H, Ferreira RM, Cunha AP, Araujo RR, Wiltbank MC. Double Ovsynch in high-producing dairy cows: effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology* 2013; 79: 159–64.
- [24] Giordano, J. O., et al. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2012; 95: 639-653.
- [25] Wiltbank MC et al. Managing the dominant follicle in high-producing dairy cows. *Soc Reprod Fertl suppl* 2010; 67: 231-245.
- [26] Galvao KN, Sa Filho MF, Santos JE. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 212–8.
- [27] Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME, Fike KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Dairy Sci* 1996; 74, 1424-1440.
- [28] Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod* 1989; 41: 997-1003.
- [29] Adams, G. P., Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod Fertl* 1992; 94:117.
- [30] Cupp ASM et al. Two concentrations of progesterone (P4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* 1992; 44: 64 (Abstr.)
- [31] Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertl* 1993; 97: 197.
- [32] Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertl* 1994; 102:123.
- [33] Imakawa, K, Day ML, Zalesky DD, Garcia-Winder M, Kittok RJ, Kinder JE. Regulation of pulsatile LH secretion by ovarian steroids in the heifer. *J Anim Sci* 1986; 63:162.

- [34] Cupp A Et al. Concentration of progesterone (P4) in circulation has a differential effect on biochemical characteristics of dominant follicles in cows. *J Anim Sci* 1993; 71:211 (Abstr.)
- [35] Santos JEP, Rutigliano HM, Sá Filho MF. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprodu Sci* 2009; 110: 207-221.
- [36] Bamber RL, Shook GE, Wiltbank MC, Santos JE, Fricke PM. Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2009; 92: 5739–5753.
- [37] Herlihy MM. et al. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2012; 95: 7003-7014.
- [38] Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprodu Fertil* 1996; 106: 39-47.
- [39] Souza AH et al. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J Dairy science* 2007; 90: 4623-4634.

Tabela 1. Efeito da pré-sincronização, Double Ovsynch e P₄-OV, sobre a dinâmica folicular de vacas leiteiras em lactação submetidas ao protocolo Ovsynch.

	Double-Ov	P4-OV	<i>P</i>
Taxas (%):			
Pré sincronização	94,2 (49/52)	92,0 (46/50)	0,66
CL no Dia 0	57,7 (30/52)	36,0 (18/50)	0,03
Ovulação ao 1º GnRH	86,3 (44/51)	81,2 (39/48)	0,50
Persistência folicular	5,88 (3/52)	14,3 (7/49)	0,20
Sincronização no Dia 9	84,6 (44/52)	86,0 (43/50)	0,84
Ovulação ao 2º GnRH	90,9 (40/44)	86,0 (37/43)	0,48
Diâmetros (mm):			
FD no Dia 0	17,2 ± 0,7	18,6 ± 0,8	0,28
FD no Dia 9	17,6 ± 0,5	17,9 ± 0,4	0,48
CL no Dia 24	27,9 ± 0,7	29,4 ± 0,8	0,19

FD, folículo dominante; CL, Corpo Lúteo

Tabela 2. Efeito de interação da estação do ano (verão ou inverno) e grau de sangue (HPB ou GR) na taxa de concepção aos 30 e 60 dias pós IA e na perda gestacional

	Verão	Inverno	<i>P</i>	GR	HPB	<i>P</i>
Taxas (%)						
Concepção	40,8	37,3	0,44	38,5	43,6	0,34
aos 30 dias	(114/279)	(60/161)		(133/346)	(41/94)	
Concepção	37,3	35,4	0,73	35,8	40,4	0,39
aos 60 dias	(104/279)	(57/161)		(123/346)	(38/94)	
Perda	7,9 (9/114)	1,6 (1/60)	0,09	6,1	4,9	0,75
gestacional				(8/132)	(2/41)	

HPB, Holandês; GR= Girolando (Holandês vs Gir Leiteiro)

Tabela 3. Efeitos dos protocolos de pré-sincronização sob a concentração de P₄ circulante

	Double-Ov	P4-Ov	<i>P</i>
Concentração de progesterona (ng/ml)			
1° GnRH	3,2 ± 0,4	3,8 ± 0,6	0,36
Prostaglandina	3,7 ± 0,7	5,1 ± 0,8	0,15
Dia 24	4,7 ± 0,6	5,9 ± 0,9	0,84
Taxas de vacas (%)			
[P4] <1,0 ng/ml no 1° GnRH	13,6 (3/22)	5,0 (1/20)	0,37
[P4] >1ng/ml na PGF	77,3 (17/22)	95,0 (19/20)	0,14

P, progesterona; PGF, prostaglandina

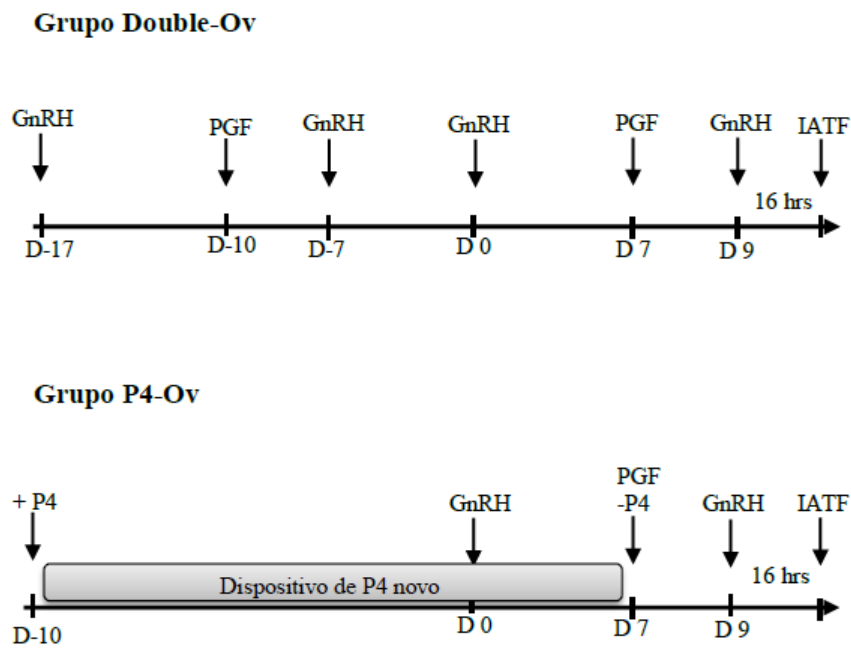


Figura 1: Esquema dos protocolos experimentais Double-Ov e P4-Ov.

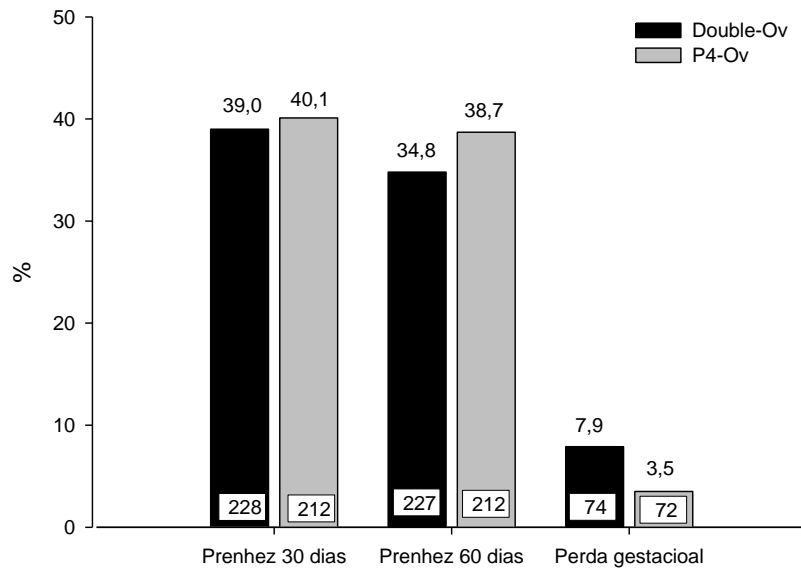


Figura 2: Efeito do protocolo de pré-sincronização, Double-Ov e P4-Ov, na taxa de prenhez aos 30 e 60 dias e na perda embrionária em vacas leiteiras em lactação.