

DIÂMETRO FOLICULAR E FERTILIDADE DE VACAS MISTIÇAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE IATF COM AJUSTES NO PROESTRO

(Follicular diameter and fertility of dairy cows submitted to IATF protocol with adjustments in proestrus)

Alexandra Soares Rodrigues¹, Mariana Alves Andrade Silva, Tiago Oliveira Brandão, Rodrigo Freitas Bittencourt, Marcos Chalhoub, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho

¹Correspondência: alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

RESUMO: Objetivou-se comparar protocolos de sincronização com uma e duas aplicações de um luteolítico simultâneas ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre o diâmetro do folículo ovulatório (DFOL) e a taxa de concepção de fêmeas mestiças leiteiras cíclicas. Para tanto, no D0 foi iniciado o protocolo com a inserção de dispositivo de progesterona (P4) e aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol. No D7 receberam 12,5mg de dinoprost trometamina. No D9 os implantes de P4 foram removidos e aplicou-se 0,6mg de cipionato de estradiol. Nesse momento, as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle - 2,5mL de solução fisiológica, Grupo 2PGF - 12,5mg de dinoprost trometamina, Grupo eCG - 300UI de eCG, Grupo 2PGF+eCG - 300UI de eCG e 12,5mg de dinoprost trometamina. No D11 foi realizada ultrassonografia transretal (US) para determinar o DFOL e os animais foram inseminados. O diagnóstico de gestação foi realizado por US 55 dias após. Os dados obtidos foram avaliados pelo SPSS considerando $P \leq 0,05$. O DFOL e as taxas de prenhez foram semelhantes entre os protocolos de sincronização. Conclui-se que em animais cíclicos a utilização de protocolos com uma única dose PGF2 α e sem suporte gonadotrófico do eCG parece proporcionar adequada resposta folicular e índices de fertilidade satisfatórios.

Palavras-chave: bovinos; gonadotrofina coriônica equina; luteólise; taxas de concepção

ABSTRACT: The objective of this study was to compare synchronization protocols with one and two applications of a luteolytic, simultaneous or not, to equine chorionic gonadotrophin (eCG) on the diameter of the ovulatory follicle (DFOL) and the conception rate of cyclic dairy crossbred females. For this, on D0 the protocol was initiated by means of insertion of progesterone device (P4) and application of 2.0mg of estradiol benzoate. In D7 they received 12.5mg of dinoprost tromethamine. In D9 performed removal of P4 and applied 0.6mg of estradiol cypionate. At this time, females were subdivided into the following treatments: Control Group - 2.5mL of saline solution, Group 2PGF - 12.5mg of dinoprost tromethamine, eCG, Group eCG - 300UI eCG, Group 2PGF + eCG - 300UI eCG and 12.5mg of dinoprost tromethamine. In D11 transrectal ultrasonography (US) was performed to determine the DFOL and the animals were inseminated. The diagnosis of gestation was performed for 55 days after. The obtained data were evaluated by the SPSS considering $P \leq 0.05$. The DFOL and conception rate were similar between synchronization protocols. It was concluded that in cyclic animals the use of protocol with a single PGF2 α dose and without gonadotropic support of eCG seems to provide adequate follicular response and satisfactory fertility indexes.

Key Words: bovine; conception rate; equine chorionic gonadotropin; luteolysis

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) constitui uma ferramenta que permite a superação dos históricos entraves de acurácia na detecção de estro e anestro pós-parto característico de rebanhos mestiços criados à pasto no Brasil (Baruselli et al., 2012). Neste contexto, o emprego da IATF na bovinocultura de leite brasileira cresceu linearmente nos últimos anos, sendo acompanhada por um incremento na comercialização de doses de sêmen que pode ser comprovado pelo último relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2015), o qual aponta um aumento entre os anos de 2009 a 2014 na ordem 33,80% nas vendas de doses de sêmen de touros de raças leiteiras.

Os programas de IATF atingiram considerável estágio de desenvolvimento tecnológico e em países da América do Sul os protocolos mais utilizados se baseiam no controle da emergência folicular e da ovulação por meio da associação entre progestágenos e benzoato de estradiol, seguida da retirada dos dispositivos de progesterona e tratamento com fármacos luteolíticos que permitem um término sincronizado da fase luteínica e, finalmente, a aplicação de ésteres de estradiol que constituem os agentes mais empregados na indução do estro e da ovulação (Binelli et al., 2014a).

Apesar da evolução alcançada pelas modernas técnicas de sincronização, os resultados obtidos em rebanhos leiteiros ainda são baixos com índices de fertilidade variando entre 35 a 55% (Bó et al., 2013). Uma alternativa para melhorar este quadro, é a realização de pequenos ajustes nos protocolos de IATF (Wiltbank et al., 2014).

Nos últimos anos tem se verificado um crescente interesse nos estudos a respeito da manipulação final dos

protocolos de IATF para gerar um perfil endócrino ideal no proestro com níveis mínimos de progesterona concomitante a elevação das concentrações de estrógeno produzidas pelo crescimento do folículo dominante e consequente ovulação. Entre as várias propostas pode-se destacar a realização de uma luteólise completa proporcionando um declínio uniforme da progesterona em conjunto com um *priming* de estrógeno fornecido pelo suporte gonadotrófico por meio do tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Binelli et al., 2014b).

A luteólise completa pode exercer efeito positivo sobre os resultados dos protocolos de IATF por proporcionar baixas concentrações de progesterona durante o período pré-ovulatório e adequadas taxas de fertilização (Wiltbank et al., 2014). Pereira et al. (2015) verificaram melhores índices de concepção em vacas Holandesas de alta produção cíclicas e acíclicas por meio do uso de duas doses de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Entretanto, Brusveen et al. (2009) e López-Gatius et al. (2015) demonstraram em programas de sincronização a base de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) em vacas leiteiras que o aumento do número de administrações de PGF_{2α} não promoveu efeito sobre a fertilidade, apesar de ter obtido uma melhor regressão luteal alcançando mínimos níveis de progesterona no momento da IATF.

Seguindo outra linha de pesquisa, o eCG é um fármaco que se liga a receptores de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) do folículo e a receptores de LH no corpo lúteo (CL), aumentando o diâmetro e a capacidade esteroidogênica destes (Rensis e López-Gatius; 2014). Segundo Nunez-Olivera et al. (2014), quando utilizado em protocolos de sincronização, o eCG

estimulou o crescimento folicular, que por sua vez aumentou a taxa de ovulação, o diâmetro do CL e a concentração sérica de progesterona após a inseminação e estes efeitos parecem ser mais acirrados em vacas leiteiras comerciais criadas à pasto (Souza et al., 2009; Garcia-Ispierto et al., 2012; Rensis e López-Gatius; 2014).

Diante da escassez de estudos avaliando a capacidade da dupla dose de um luteolítico associada ou não ao uso do eCG em ajustar o proestro, o objetivo deste trabalho foi comparar protocolos de sincronização com uma e duas aplicações de um luteolítico simultâneas ou não ao eCG sobre o diâmetro do folículo ovulatório (DFOL) e a taxa de concepção de fêmeas mestiças leiteiras cíclicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2015 e abril de 2016 na Fazenda Experimental de Entre Rios da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA), localizada no município de Entre Rios região Nordeste da Bahia, com latitude 11°56'31"sul, longitude 38°05'04"oeste e estando a uma altitude de 162 metros. A região apresenta pluviosidade média anual de 1.251mm e possui clima do tipo subtropical úmido. A propriedade adotava um sistema extensivo de criação de animais em pastagem predominantemente de *Bacharia Decumbens*, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Foram utilizadas 116 fêmeas mestiças 3/4 Gir x Holandês não lactantes, pertencentes à categoria múltipara, idade média de 5,69±1,06 anos, com escore de condição corporal (ECC) de 3,01±0,39 avaliado utilizando-se a escala de 1 a 5 (Houghton et al., 1990).

Previamente ao início da sincronização, os animais foram submetidos a um exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China), sendo consideradas aptas a participarem do experimento, fêmeas que apresentaram no momento da avaliação ausência de anormalidades no trato reprodutivo.

Todos os animais usados no experimento dessa propriedade foram vacinados contra doenças da esfera reprodutiva e obedeciam ao calendário oficial estadual de vacinação, sendo manipulados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais institucional (CEUA-EMEVZ/UFBA, nº052/2015).

As vacas utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas por meio da avaliação da presença de CL nos ovários por ultrassonografia transretal com transdutor linear e frequência de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China), sendo considerados aptas a participar do experimento aquelas com presença de tecido luteal com diâmetro $\geq 1,5$ cm (Leal et al., 2009) no início do tratamento hormonal.

O protocolo de sincronização começou em um dia aleatório denominado D0 por meio da inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1,0g de progesterona (Sincrogest[®], Ourofino, São Paulo, Brasil), associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol[®], Ourofino, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular (IM), imediatamente após a identificação da estrutura luteal. No dia sete (D7) esses animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) IM. No dia nove (D9) foi realizada a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona e se aplicou 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P.[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) IM, neste momento,

as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle (n=31) - foi administrado 2,5mL de solução fisiológica IM; Grupo 2PGF (n=30) - aplicou-se 12,5mg de dinoprost trometamina im; Grupo eCG (n=28) - administrou-se 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) IM; Grupo 2PGF+eCG (n=27) - foi realizado a aplicação de 300UI de eCG IM e 12,5mg de dinoprost trometamina IM. No dia 11 (D11) do protocolo de sincronização previamente a IATF, todos os animais foram examinados por ultrassonografia transretal com transdutor linear com frequência de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China) para mensuração do diâmetro do folículo ovulatório (DFOL). As inseminações foram realizadas utilizando sêmen criopreservado comercializado de um único touro da raça Girolando que se enquadrava dentro dos padrões mínimos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (Henry et al., 2013). No momento da IA, o sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos e as inseminações foram efetuadas pelo mesmo técnico.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal, 55 dias após as inseminações, utilizando transdutor linear de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China). Foi considerado diagnóstico de gestação positivo a presença de um feto visível com viabilidade confirmada (batimento cardíaco). A taxa de concepção foi calculada dividindo o total de vacas gestantes pelo total de vacas inseminadas.

Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19). Para tanto, se realizou a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio-padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise

descritiva; 2- As diferenças entre as médias de DFOL nos distintos grupos experimentais foram comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. 3- A taxa de concepção entre os grupos Controle, 2PGF, eCG e 2PGF+eCG foram comparadas empregando um estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). 4- A variável resposta no diagnóstico de gestação foi assumida a apresentar distribuição binomial e foi analisada com base na metodologia de regressão logística. O modelo para probabilidade de concepção (P_i) foi: $P_i = 1/1+e^{-(B_0+B_1X_1+B_2X_2+B_3X_3+\dots+B_nX_n)}$ em que: $P_i = 1/1+e^{-(0,33+0,04eCG+0,192PGF+0,702PGF+eCG)}$. Para todas as análises foram consideradas diferenças significativas quando o $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tentativas de ajustes no proestro implementadas no presente estudo foram incapazes de proporcionar distinções no diâmetro folicular entre os animais submetidos à aplicação de uma e duas doses de um luteolítico simultâneo ou não ao estímulo do eCG. Os tratamentos Controle e eCG apresentaram um DFOL de em média $11,53 \pm 2,64$ e $11,52 \pm 2,98$ mm, semelhante aquele apresentado pelos grupos 2PGF e 2PGF+eCG de $11,36 \pm 3,02$ e $12,13 \pm 2,51$ mm, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão (S) do diâmetro do folículo ovulatório (DFOL) de fêmeas cíclicas submetidas a protocolos de sincronização com uma e duas doses de prostaglandina (PGF2 α) associada ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG).

Protocolos de sincronização	N° de animais	DFOL
		Média \pm S (mm)
Controle ¹	31	11,53 \pm 2,64
2PGF ²	30	11,36 \pm 3,02
eCG ³	28	11,52 \pm 2,98
2PGF+eCG ⁴	27	12,13 \pm 2,51
Total	116	11,63 \pm 2,76

¹Controle: 2,5mL de solução fisiológica no dia nove, ²PGF: Prostaglandina F2 α (12,5mg de dinoprost trometamina) no dia nove, ³eCG: 300UI de gonadotrofina coriônica equina no dia nove, ⁴2PGF+eCG: prostaglandina F2 α (12,5mg de dinoprost trometamina) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina no dia nove.

No entanto, alguns estudos apontaram a ação benéfica da dupla dose de PGF2 α sobre a regressão do CL, proporcionando uma luteólise completa que favorece o crescimento folicular, a elevação dos níveis de estrogênio no proestro e a ovulação em protocolos de IATF (Binelli et al., 2014a; 2014b). Corroborando a estes achados, Martins et al. (2011b) verificaram que ocorreu um incremento linear das dimensões e funcionalidade do folículo dominante imediatamente após um eficiente tratamento luteolítico, se estendendo até a ovulação.

Seguindo esta linha de pesquisa, estudos pioneiros de Brusveen et al. (2009) em vacas de leite determinaram a importância de se empregar a dupla dose de PGF2 α para a promoção de um perfil endócrino adequado em protocolos de IATF, aumentando o desenvolvimento folicular em relação aos animais submetidos a uma única aplicação do fármaco. Segundo Ribeiro et al. (2012) a administração de duas doses de um luteolítico em momentos distintos incrementaram os parâmetros estruturais foliculares em relação a uma única aplicação com altas concentrações do fármaco.

Em contraposição as afirmações supracitadas, o emprego de uma aplicação de PGF2 α foi capaz de proporcionar condições adequadas ao crescimento folicular neste estudo, não sendo observado efeito da duplicação da dose de um luteolítico sobre o diâmetro folicular. Concordando aos trabalhos de Santos et al. (2010), os quais não constataram diferenças no DFOL entre animais tratados com uma e duas doses de um luteolítico em protocolos a base de GnRH. Pereira et al. (2015) também não encontraram efeito da dupla dose de PGF2 α sobre o DFOL em animais leiteiros de alta produção submetidos a protocolos a base de progesterona e estrógeno.

Em estudos muito semelhantes a esta pesquisa, porém em protocolos de curta duração a base de GnRH em vacas de leite de alta produção, Garcia-Ispierto e López-Gatius (2014) e López-Gatius et al. (2015) não evidenciaram distinções entre o DFOL em protocolo com associação de uma e duas doses de PGF2 α ao uso ou não do eCG.

No entanto, diversos estudos apontaram a ação benéfica do eCG sobre o crescimento folicular na IATF, sugerindo sua utilização como ferramenta de incremento das dimensões foliculares, da esteroidogênese e da resposta ovulatória de fêmeas leiteiras submetidas a protocolos de IATF, sobretudo nos animais acíclicos, com baixos escores de condição corporal e criados à pasto (Bó et al., 2013; Rensis e López-Gatius, 2014).

Divergindo deste experimento, Sá Filho et al. (2010) trabalharam com programas de sincronização em fêmeas *Bos taurus indicus* tratadas ou não com 400UI de eCG e obtiveram diferenças estatísticas para o DFOL (12,00 e 9,00mm). De forma similar, Peres et al. (2009) mostraram que a administração de 300UI de eCG proporcionou um DFOL de 12,00mm, significativamente superior aquele apresentado pelo grupo controle de 11,00mm, em complementação a estes achados os últimos autores observaram que a aplicação da PGF2 α dois dias antes da remoção da progesterona exerceu efeitos positivos sobre as características foliculares e minimizou a influência do não tratamento com eCG. Dias et al. (2009) confirmaram estes resultados em novilhas *Bos taurus indicus*, demonstrando que o suporte gonadotrófico é essencial sobretudo em protocolos de sincronização com curto proestro.

De forma semelhante ao presente estudo, Pulley et al. (2013) e Ferreira et al. (2013) desenvolveram experimentos

com dinâmica folicular em vacas leiteiras cíclicas com o uso ou não de diferentes doses de eCG e concordando com os resultados expostos nesta pesquisa, não verificaram distinções no tamanho do folículo pré-ovulatório. Os autores justificaram tal achado pelo fato de terem trabalhado com vacas leiteiras de alta produção com dietas extremamente energéticas apresentando grande estímulo endógeno de LH para sustentar o crescimento folicular, não necessitando de suporte gonadotrófico exógeno.

Subsequentemente, Souza *et al.* (2009) e Garcia-Ispuerto *et al.* (2012) evidenciaram que o efeito positivo do eCG em fêmeas de alta produção ocorreu apenas em animais com baixo escore corporal e longo período de anestro pós-parto. Desta forma, apesar deste experimento não se tratar de vacas leiteiras de alta produção e utilizar fêmeas mestiças comerciais criadas à pasto, a limitada ação do eCG neste trabalho pode ser explicada devido a todos os animais utilizados se encontrarem em uma condição cíclica confirmada pela presença do CL, além de um adequado ECC, apresentando suficiente suporte gonadotrófico para o crescimento folicular.

No que se refere aos índices de fertilidade, não houve diferença entre os grupos experimentais Controle, 2PGF, eCG e 2PGF+eCG apresentando taxas de concepção de respectivamente, 41,9%; 46,7%; 42,9% e 59,3% como esboçado na Tabela 2. De acordo com a regressão logística também não foi verificada diferença na probabilidade de concepção para nenhum tratamento.

A semelhança entre os índices de fertilidade nos protocolos empregando uma e duas doses de PGF2 α concomitante ou não ao eCG sugerem que os distintos tratamentos proporcionaram uma resposta hormonal equivalente. Divergindo dos resultados reportados por Santos *et al.* (2010), Martins *et al.* (2011a), Ribeiro *et al.* (2012) e Wiltbank *et al.* (2015), os quais verificaram que uma aplicação adicional de PGF2 α em um protocolo de IATF a base de GnRH incrementou a probabilidade de concepção por meio do fornecimento de um ambiente endócrino com mínimos níveis de progesterona nas vacas leiteiras. Contudo para Wiltbank *et al.* (2015), estas condições foram relacionadas a categoria animal, onde apenas vacas multíparas demonstraram um aumento em torno de 10% nos índices de fertilidade.

Em experimentos com protocolos a base de progesterona e estradiol Pereira *et al.* (2015) também encontraram melhores taxas de concepção em vacas Holandesas lactantes submetidas ao duplo tratamento com um luteolítico em relação ao protocolo convencional. Estes autores acreditaram que tais resultados poderiam ser explicados pelo fato da aplicação extra de PGF2 α , proporcionarem um ambiente no trato genital feminino mais adequado a capacitação espermática e a fertilização favorecendo o estabelecimento da gestação.

No entanto, Brusveen *et al.* (2009) trabalhando com animais da raça Holandesa, demonstraram que o tratamento com duas doses de PGF2 α em programas de sincronização, apesar de proporcionar uma maior eficiência na luteólise em relação aos animais submetidos a um único tratamento, foi incapaz de promover elevações dos índices de fertilidade. De forma semelhante aos resultados deste estudo, pode-se atribuir a ausência de

Tabela 2 - Taxa de concepção de vacas mestiças cíclicas submetidas a protocolos de sincronização com uma e duas doses de prostaglandina (PGF2 α) associada ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG).

Protocolos de sincronização	N° de animais	Taxa de concepção % (N°)
Controle ¹	31	41,9% (13/31)
2PGF ²	30	46,7% (14/30)
eCG ³	28	42,9% (12/28)
2PGF+eCG ⁴	27	59,3% (16/27)
Total	116	47,4% (55/116)

¹Controle: 2,5mL de solução fisiológica no dia nove. ²PGF: Prostaglandina F2 α (12,5mg de dinoprost trometamina) no dia nove. ³eCG: 300UI de gonadotrofina coriônica equina no dia nove. ⁴2PGF+eCG: prostaglandina 2 α (12,5mg de dinoprost trometamina) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina no dia nove.

diferença significativa, à pequena magnitude do efeito da duplicação da dose de PGF2 α sobre os índices de concepção, incrementando estes parâmetros apenas numericamente. Pereira et al. (2013) também não evidenciaram influência desta estratégia sobre as taxas de concepção em programas de sincronização em fêmeas bovinas leiteiras.

Adicionalmente, Ferreira et al. (2013) e Pulley et al. (2013) desenvolveram pesquisas com o uso ou não de 400UI de eCG em protocolos de IATF em vacas Holandesas de alta produção não sendo verificado incremento significativo na probabilidade de gestação dos animais tratados com eCG, fortalecendo os indícios que a ação gonadotrófica do eCG, parece não exercer benefício adicional sobre a fertilidade de animais submetidos a um aporte nutricional adequado e em condições cíclicas.

Os achados supracitados foram suportados por Souza et al. (2009) e Garcia-Ispierto et al. (2012), os quais obtiveram uma elevação significativa nas taxas de concepção de fêmeas leiteiras em anestro tratadas com eCG e atribuíram tais diferenças ao incremento do crescimento folicular e ovulação exercido pelo suporte de LH proporcionado pelo eCG nas fêmeas em condições acíclicas e com baixos escores de condição corporal. Contudo, apesar do presente estudo trabalhar com fêmeas mestiças criadas a pasto, pode-se sugerir que em decorrência da ciclicidade reprodutiva e do adequado ECC esboçado pelos animais, o eCG não foi eficiente em elevar a fertilidade do rebanho.

Trabalhos com uma e duas doses de um agente luteolítico simultâneo ou não ao uso do eCG, porém em protocolos a base de GnRH foram desenvolvidos por Garcia-Ispierto e López-Gatius (2014) e López-Gatius et al. (2015) e verificaram probabilidade de

gestação equivalentes entre todos os tratamentos, em animais da raça Holandesa de alta produção, estabelecendo que de forma similar a esta pesquisa, as estratégias implementadas não afetaram estatisticamente os resultados do programa de IATF.

É importante destacar que no presente estudo, a duração do proestro foi um parâmetro uniforme em todos os tratamentos e segundo relatos de Dadarwal et al. (2013) constitui um fator crucial nos protocolos de sincronização de animais cíclicos, em face as evidências de que o prolongamento do proestro por meio da antecipação do tratamento com PGF2 α em protocolo a base de progesterona e benzoato de estradiol parece possibilitar um eficiente aumento dos parâmetros estruturais foliculares com conseqüente incremento dos índices de fertilidade.

Deste modo, as tentativas de manipulação do proestro testadas nestes estudos não impactaram o diâmetro folicular e os índices de concepção, sugerindo que o longo proestro alcançado em todos os protocolos de sincronização, com duração de aproximadamente quatro dias pode ter sido eficaz em incrementar e favorecer a atividade folicular e fertilidade, minimizando o efeito das demais estratégias testadas como a dupla dose de um luteolítico e o estímulo do eCG.

CONCLUSÃO

O diâmetro folicular e os índices de fertilidade não foram afetados pelo tratamento com uma e duas aplicações de um agente luteolítico simultâneas ou não ao eCG sugerindo que em animais cíclicos a utilização de protocolos de sincronização com uma única dose PGF2 α e sem o suporte gonadotrófico do eCG parece proporcionar adequada

resposta folicular e índices de fertilidade satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL - ASBIA. **Index ASBIA Mercado 2014**, Uberaba, MG, 2015. 30p. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>. Acesso: 01 Fev. 2016.

BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V. et al. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 139-152, 2012.

BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V.V. et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. **Animal Reproduction**, v.11, p.246-253, 2014b.

BINELLI, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J.L.M. et al. [2014a]. **Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility**. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mario_Binelli/publication/268506071_Fertility_of_fixed-time_protocols_in_dairy_cattle_Evolution_in_fixed-time_from_synchronization_of_ovulation_to_improved_fertility/links/546cf4280cf2a7492c55aefa.pdf. Acesso: 05/03/2016.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MAPLETOFT, R.J. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v.10, p.137-142, 2013.

BRUSVEEN, D.J.; SOUZA, A.H.; WILTBANK, M.C. Effects of additional prostaglandin F_{2α} and estradiol-17β during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.4, p.1412-1422, 2009.

DADARWAL, D.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. et al. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.79, p.859-866, 2013.

DIAS, C.C.; WECHSLER, F.S.; DAY, M.L. et al. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F₂ treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v.72, p.378-385, 2009.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; SALES, J. N. S. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.140, n.1, p.26-33, 2013.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of different five-day progesterone-based fixed-time AI protocols on follicular/luteal dynamics and fertility in dairy cows. **The Journal of reproduction and development**, v.60, p.426-432, 2014.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-HELGUERA, I.; MARTINO, A. et al. Reproductive Performance of Anoestrous High-Producing Dairy Cows Improved by Adding Equine Chorionic Gonadotrophin to a Progesterone-Based Oestrous Synchronizing Protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.752-758, 2012.

HENRY, M., NEVES, J.P., JOBIM, M.I.M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 104 p.

HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; MOSS, G.E. et al. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Jornal Animal Science**, v.68, p.1428-1437, 1990.

- LEAL, L.D.S.; OBA, E.; FERNANDES, C.A.D.C. et al. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.174-183, 2009.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-HELGUERA, I.; RENSIS, F. et al. Effects of different five-day progesterone-based synchronization protocols on the estrous response and follicular/ luteal dynamics in dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.61, p.465-471, 2015.
- MARTINS, J.P.N.; POLICELLI, R.K.; NEUDER, L.M. et al. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 2815-2824, 2011a.
- MARTINS, J.P.N.; POLICELLI, R.K.; PURSLEY, J.R. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.6, p. 2806-2814, 2011b.
- NUNEZ-OLIVERA, R.; CASTRO, T.; GARCIA-PINTOS, C. et al. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattler. **Animal Reproduction Science**, v.146, p.111-116, 2014.
- PEREIRA, M. H. C.; RODRIGUES, A. D. P.; MARTINS, T. et al. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6904-6914, 2013.
- PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C.; BARBOSA, L.F.S.P. et al. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the yea. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.947-959, 2015.
- PERES, R.F.G.; JÚNIOR, C.; FILHO, O.G.S. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.72, p.681-689, 2009.
- PULLEY, S.L.; WALLACE, L.D.; MELLIEON, H.I. et al. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v.79, n.1, p.127-134, 2013.
- RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.177-182, 2014.
- RIBEIRO, E.S.; BISINOTTO, R.S.; FAVORETO, M.G. et al. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.78, p.273-284, 2012.
- SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 651-658, 2010.
- SANTOS, J.E.P.; NARCISO, C.D.; RIVERA, F. et al. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on

reproduction of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2976-2988, 2010.

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

WILTBANK, M.C.; BAEZ, G.M.; COCHRANE, F. et al. Effect of a second treatment with prostaglandin F₂α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.12, p.8644-8654, 2015.

WILTBANK, M.C.; BAEZ, G.M.; VASCONCELOS, J.L.M. et al. The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v.11, p.225-236, 2014.