

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós Graduação em Zootecnia**



**Dissertação**

**Uso de Benzoato de estradiol no início do protocolo Heat Synch em vacas da raça holandês lactantes**

**LAÍS FERNANDA MIELKE**

**Pelotas, 2013**

**Produção Animal: Uso de Benzoato de estradiol no início do protocolo Heat Synch em vacas da raça holandês lactantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal: ênfase em reprodução de bovinos).

Orientador: Dr. Luiz Francisco Augusto Burkert Del Pino  
Co-orientadores: Dr. Cássio Cassal Brauner  
Dr. Marcio Nunes Corrêa  
Dra. Viviane Rohrig Rabassa

Pelotas, 2013

**Banca examinadora:** Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Dr. Luiz Francisco M. Pfeifer

Dr. Eduardo Schmitt

Dra. Ligia Margareth Pegoraro

## **Agradecimentos**

Deus, que me deu toda coragem para enfrentar os desafios e encarar as oportunidades, que nos dias e noites de angústia, me encorajou e me deixou forte para seguir em frente.

A minha mãe que me educou de maneira a respeitar todos os indivíduos e acreditar em tudo que poderia conquistar

Meu irmão Flávio Mielke, pelo incentivo em aprimorar os conhecimentos profissionais e ajuda em conquistar.

Gustavo Martins Silva, sempre presente, disponível a qualquer sacrifício.

Família que rezou quando estive sozinha, quando estive longe.

Aos amigos Gustavo Crochemore e Josiane Feijó por não permitirem que eu desistisse e fazerem parte desta conquista.

Aos colegas e amigos Ana Rita Krause, Diego Acosta e Márcio Lima, fundamentais para execução do estudo.

A pesquisadora Renata Wolf Suñé Martins Silva, que me passou seus conhecimentos e acreditou e apostou em mim.

Ao grupo e família NUPEEC, pela compreensão, orientação e amizade.

A Granjas 4 Irmãos, gerente Eduardo Xavier, que permitiu a realização do estudo, disponibilizando seus animais.

Ao orientador Francisco Augusto Burkert Del Pino pela confiança, apoio e incentivo.

Aos co-orientadores Cássio Cassal Brauner pelo apoio e esforço para execução do estudo, pelos ensinamentos a mim prestados, assim como Viviane Rohrig Rabassa e Márcio Nunes Corrêa. Augusto Schneider que me auxiliou no projeto e preparação deste trabalho.

E minhas sobrinhas Karine e Katherine, por simplesmente existirem e tornarem meus dias mais felizes.

*Dedico este trabalho em memória a meu pai  
Guiomar Rudi Mielke, que me deixou cedo....*

## RESUMO

MIELKE, Laís Fernanda. **Uso de Benzoato de estradiol no início do protocolo Heat Synch em vacas da raça holandês lactantes.** 2013. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso do benzoato de estradiol na indução e sincronização do desenvolvimento folicular em vacas da raça Holandesa durante um protocolo Heat Synch. Foram incluídos no protocolo Heat synch duzentos e trinta vacas da raça Holandesa entre primíparas (n= 110) e múltiparas (n= 120) consistindo de um CIDR contendo 1,9 g de progesterona, novo ou usado anteriormente uma vez (7d uso), mais 25 mg de GnRH intramuscular (IM) ou injeção de 2mg de benzoato de estradiol (BE) no dia 0 (82 + 6 DEL) e todas as vacas receberam 25mg de PGF2a IM durante a remoção do CIDR, sete dias depois (dia 7), seguido de uma injeção de 1mg de cipionato de estradiol (ECP) IM no dia 8 CIDRs usados foram cuidadosamente lavados com uma solução desinfetante suave, secas ao ar e armazenadas em um recipiente seco, fechado após a primeira utilização. Os animais foram então observados para sinais de cio (duas vezes ao dia, às 7:00 e 18:00 ) por três dias após a retirada do CIDR . Vacas observadas em cio foram inseminadas 12 horas depois. Os elementos fixos analisados foram utilizados para o hormônio na indução da onda o folicular, no início do protocolo Heat Synch, GnRH (n = 120) e de benzoato de estradiol (BE) (n = 110 ) , e utilização do CIDR (novo, de segundo ou terceiro uso ) . Um único técnico foi responsável pela detecção de cio e inseminações. O diagnóstico de gestação foi determinado por ultrassonografia aos 30 a 35 d. Os dados foram analisados pelo procedimento LOGISTIC do SAS. A taxa de concepção não diferiu (P= 0,86) entre os grupos hormônio GnRH e BE. Além disso, não houve diferença (P= 0,18) em sinais de cio entre tratamentos com hormônios, bem como entre vacas primíparas e múltiparas (P = 0,23). Os usos de CIDR não diferiu (P = 0,75) na taxa de concepção. Também não houve interação (P> 0,05) entre os usos de CIDR e tratamentos de hormônios. Em conclusão, o BE pode ser usado para induzir e sincronizar a onda folicular no início do protocolo Heat Synch em vacas leiteiras, bem como as taxas de concepção não são afetadas pelo uso de CIDR .

Palavras chave: Cio, GnRH, BE, Concepção

## ABSTRACT

**MIELKE, Lais Fernanda. Use of estradiol benzoate at the beginning of the heat synch protocol in lactating Holstein cows. In 2013. Dissertação (Master). Programa de pós graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

The aim of this study was to evaluate the use of estradiol benzoate inducing and synchronizing the follicular development in Holstein cows during a Heat Synch protocol. Two hundred and thirty primiparous (n= 110) and multiparous (n= 120) Holstein cows were enrolled in a Heat synch program consisting of a CIDR containing 1.9 g of progesterone, either a new one or previously used once (7d use), plus either 25 µg GnRH i.m or 2mg estradiol benzoate (EB) injection on day 0 (82 + 6 DIM) and all cows were given 25 mg PGF2α i.m upon CIDR removal seven days later (day 7) followed by an injection of 1 mg of estradiol cypionate (ECP) i.m at day 8. Used CIDRs had been thoroughly rinsed with a mild disinfectant solution, air-dried, and stored in a dry, enclosed container after first use. Cows were then observed for signs of estrus (twice daily at 7:00 and 18:00) for three days following CIDR removal. Cows observed in estrus were inseminated 12 h later. The fixed factors analyzed were the hormone used to the follicular wave induction at the beginning of Heat Synch protocol, GnRH (n = 120) and estradiol benzoate (EB) (n = 110), and the CIDR uses (either a new one, second or third use). A single technician was responsible for the estrus detection and inseminations. Pregnancy status was determined by ultrasonography at 30 to 35 d. Data were analyzed by the LOGISTIC procedure of SAS. Conception rate did not differ (P =0.86) between hormone groups GnRH and EB. In addition there was no difference (P = 0.18) in estrus signs between hormones treatments, as well as between primiparous and multiparous cows (P = 0.23). The CIDR uses did not differ (P = 0.75) in conception rate. Also there was no interaction (P>0.05) between CIDR uses and hormones treatments. In conclusion, EB may be used to induce and synchronize the follicular wave at beginning of Heat Synch protocol in dairy cows, as well as conception rates are not affected by CIDR uses.

Keywords: heat, GnRH, EB, conception

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	9
2 PROJETO DE PESQUISA .....	13
2.2 Objetivos e metas.....	18
2.2.1 Objetivo geral.....	18
2.2.2 Objetivos específicos.....	18
2.6 Aspectos éticos.....	25
3. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO .....	29
4. ARTIGO.....	31
5. CONCLUSÃO GERAL .....	38



## INTRODUÇÃO GERAL

O grande e rápido progresso no manejo de seleção genética na pecuária leiteira criou uma nova realidade para indústria de laticínios, objetivando um aumento na produtividade individual por animal para satisfazer a demanda de produção leiteira. Esta capacidade de vacas leiteiras produzirem mais leite, esta intimamente ligada com sua eficiência reprodutiva (LUCY, 2001). Com isso os rebanhos leiteiros convivem com o desafio que é a baixa eficiência reprodutiva, tendo como causa principal, fatores ligados à fisiologia animal e gestão da propriedade (LUCY, 2001). No mesmo sentido, Butler (2010) relatou um declínio de 25% na eficiência reprodutiva de 1951 para 2007.

A eficiência reprodutiva do gado de leite está relacionada a fatores como a redução de intervalo entre partos, o qual é dependente de adequados manejos sanitário e nutricional e idade ao primeiro parto. Em um sistema em que a reprodução é ineficiente, ocorre aumento no descarte involuntário (cerca de 22%), diminuição da longevidade e do número de animais para reposição, menor progresso genético, maior gasto com inseminação e com medicamentos. Além disso, há redução na produção de leite, pois haverá aumento do intervalo entre lactações, assim como prolongamento do período seco da vaca e da proporção de vacas secas no rebanho (ALBARRÁN et al., 2013).

O atraso para primeira ovulação pode ser explicado pelo maior desequilíbrio energético em vacas de maior produção, que ocorre no período pós parto e é responsável por uma queda nos pulsos de LH e IGF1, em decorrência de menores níveis de estradiol sanguíneo, atrasando o retorno na atividade ovariana (BUTLER, 2000). Em decorrência da partição de nutrientes e perda de peso no período pós parto que resultam em um efeito inibitório sobre o crescimento e desenvolvimento folicular (LUCY, 2000). Além disso, durante o balanço energético negativo (BEN), os níveis de GH se elevam, tendo como função mobilizar gordura como reserva de energia, podendo desta forma transmitir informações negativas para o folículo neste período (LUCY et al., 2009), em contraste, o IGF1 está diminuído, prejudicando o eficiente desenvolvimento folicular (PATTON et AL., 2007).

Nos rebanhos leiteiros em que há partos durante o ano inteiro, as vacas devem ser manejadas individualmente e de forma mais intensiva do que as de corte. Com a meta de um bezerro por vaca por ano, o intervalo parto/concepção se limita a cerca de 85 dias, durante os quais deve ocorrer a involução do útero, a atividade ovariana deve ser retomada e o estro detectado. Em geral, por volta de 25% das vacas leiteiras não são observados em estro antes do dia 40 pós-parto. Sendo assim, o uso

de estratégias de seleção genética, tratamentos hormonais e manejo nutricional que antecipem o momento da primeira ovulação irão beneficiar a eficiência reprodutiva do rebanho.

Protocolos hormonais de inseminação artificial objetivam induzir a sincronia de estro e ovulação de vacas cíclicas, bem como em animais em anestro, causando queda nas concentrações de progesterona, crescimento e ovulação do folículo dominante (Mapletoft et al., 2003). Estes protocolos utilizados para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) possibilitam a inseminação de um maior número de vacas e aproveitamento de mão de obra, sem a necessidade de observação de cio (BARUSELLI et al., 2004), tendo em vista que um ponto crítico para eficiência reprodutiva do rebanho é a falha na detecção de cio. As taxas de concepção nestes protocolos são aceitáveis, porém menores quando comparada com inseminação acompanhada de cio (NEBEL e JOBST, 1998). Casida (1961) descreve a eficiência reprodutiva em inseminação artificial com observação de cio de 55%. Dados mais recentes são de taxas de concepção de 45% para inseminação com observação de cio (Dransfield et al., 1998) e de 35% para inseminação artificial em tempo fixo (SCHMITT et al., 1996).

O crescimento folicular e a indução da ovulação são eficientemente possíveis de serem realizados, com dia determinado para inseminação artificial, eliminando a detecção de estro (BARUSELLI et al., 2004) independente da fase do ciclo estral no início do protocolo (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). Esta sincronização é conseguida através da administração de hormônios esteroides. Já comprovado há bastante tempo a utilização do GnRH, promove a ovulação do folículo dominante e começo de uma nova onda folicular. Estudos recentes estudam e validam o uso de Benzoato de Estradiol no início do protocolo, causando uma atresia ou ovulação do folículo presente e emergência de uma nova onda folicular (BÓ et al, 2002), estes são os dois principais hormônios utilizados em protocolos de IATF (SARTORI et al., 2002). A resposta satisfatória é de 50% em protocolos utilizando benzoato de estradiol em *Bos Taurus* (Colazo et al, 1999) e em *Bos Indicus* (BARUSELLI et al, 2004). Os fármacos mais utilizados em protocolos de sincronização de cio/ovulação como já descrito, possuem funções distintas, o GnRH, induz a secreção dos hormônios FSH e LH, assim o FSH estimula o crescimento dos folículos ovarianos, enquanto o LH estimula sua maturação, produção de estradiol e ovulação. O LH dá suporte à formação e à função inicial do corpo lúteo. E um dos principais efeitos do estradiol é a indução dos sinais de estro. A progesterona é essencial para o ciclo reprodutivo normal na vaca e, após a concepção, é o principal hormônio responsável pela manutenção da gestação. A PGF2 $\alpha$  dá início à regressão do corpo lúteo, denominada luteólise, reduzindo o suprimento sanguíneo para o corpo lúteo. Portanto a PGF2 $\alpha$  fazendo a regressão do corpo lúteo, promove uma queda nas concentrações de P4, desbloqueando a liberação de GnRH, dando início a nova onda folicular (STEVENSON et al., 2004).

Utilizados a mais de quatro décadas, os dispositivos intravaginais de liberação de progesterona objetivam controlar o ciclo estral para inseminação artificial de ruminantes (CARRICK e SHELTON, 1967). O dispositivo mais utilizado mundialmente é o CIDR<sup>®</sup> <sup>1</sup>(RATHBONE et al., 1997) este dispositivo se encontra na forma de “T” contendo 1,9 g de progesterona, com potencial de reutilização após sete dias de uso (RATHBONE et al., 2002). Comercialmente sua recomendação de uso é de apenas uma utilização, porém a reutilização deste é tema de diversos estudos, principalmente em bovinos de corte. Colazo et al., (2004) não observaram diferença nas taxas de prenhez em inseminação artificial de bovinos com CIDR de primeira ou segunda utilização. Concordando (Cerri, 2005) comparou as concentrações de P4 de um CIDR novo e reutilizado, em ambos os níveis aumentaram imediatamente após a inserção e permaneceram por todo período de uso.

Diversos programas são utilizados em protocolos de inseminação de bovinos leiteiros, como Ovsynch, Select synch, heat synch, co synch, pré-synch ovsynch, sendo os quatro últimos são adaptações do protocolo ovsynch.

O protocolo Ovsynch envolve duas injeções de um análogo de GnRH intercaladas por uma única administração de PGF2 $\alpha$ . A combinação de GnRH com PGF2 $\alpha$  promove homogeneidade entre os estágios foliculares do ovário das vacas no momento da indução da luteólise. Assim, o momento de ocorrência do estro após a indução da luteólise pela prostaglandina torna-se bastante previsível, com alto sincronismo dos picos de LH, e verifica-se a sincronização tanto do desenvolvimento folicular quanto da regressão do corpo lúteo. Esta associação provoca a ovulação ou a luteinização do folículo dominante, em cerca de 85% das vacas (PURSLEY et al.,1995). O Ovsynch facilita a programação precisa da primeira IA pós parto, ao mesmo tempo em que melhora o desempenho reprodutivo. Além disso, reduz bastante a necessidade de mão de obra pela eliminação da necessidade de detecção de cio, Coleman et al. (1991) e Twagiramungu et al. (1992) observaram que a taxa de fertilidade de vacas sincronizadas com GnRH e PGF2 $\alpha$  variou entre 35 e 65% e foi semelhante à dos animais controle, inseminados no primeiro cio observado. No estudo de Vasconcelos et al. (1999) pode-se concluir que é possível obter maiores taxas de concepção quando se inicia o protocolo Ovsynch entre os dias 5 e 12 do ciclo estral. Entretanto, monitorar o ciclo estral da vaca para selecionar o momento mais promissor para iniciar o protocolo Ovsynch não é viável e, de certa forma, vem contra toda a idéia de praticidade deste sistema, de não depender do estágio do ciclo da vaca.

---

<sup>1</sup> CIDR<sup>®</sup> Pfizer Saúde Animal, Dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona

O protocolo Heat Synch, mais usado nos EUA, envolve a substituição da segunda injeção de GnRH por ésteres de estradiol (STEVENSON et al., 2004). Os conceitos são de que o estradiol melhora a sincronização da ovulação do folículo dominante e provoca aumento da expressão de estro nas vacas tratadas. Com o aumento da preocupação com o uso de estrógenos em animais para produção de alimentos, e com a impossibilidade de seu uso na Europa, a aplicação desse sistema é limitada. O estradiol exógeno, administrado junto com o progestágeno, provoca atresia do folículo dominante, quando administrado antes ou durante a emergência da onda, suprimindo FSH e LH. Quando a seleção do folículo já tiver ocorrido, esse tratamento resulta também na atresia do folículo dominante (MCDUGAL et al., 2004).

Quando se utiliza o Benzoato de Estradiol no início de um tratamento de sincronização com progestágeno, mesmo que a duração do tratamento seja estendida para 12 dias, não é possível provocar regressão completa do corpo lúteo em todos os animais até a retirada do progestágeno. Deste modo, é recomendável que a PGF2 $\alpha$  seja administrada na retirada do dispositivo, para assegurar a regressão do corpo lúteo nos animais que não responderem ao estradiol. Estudos recentes, relatam que a injeção de estradiol foi substituída pela administração de GnRH no início do tratamento STEVENSON et al., (2000). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de protocolos de IATF com o uso de Benzoato de Estradiol, sendo uma alternativa mais barata para o sistema de produção, bem como a reutilização de CIDR até o 3º uso em bovinos de leite, visto que a grande parte dos estudos é direcionada a bovinocultura de corte.

|

**Universidade Federal de Pelotas**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

**Desempenho reprodutivo de vacas leiteiras submetidas a protocolos de IATF a base de GnRH ou Benzoato de estradiol e aplicação de insulina exógena**

**Equipe:**

**Pesquisadores colaboradores:**

Marcio Nunes Corrêa, Médico veterinário, Mestre em Zootecnia e Doutor em Biotecnologia

Viviane Rabassa

Augusto Schneider

Cássio Cassal Brauner

Charles Ferreira Martins

Eduardo Gonçalves Xavier

Eduardo Schmitt

Francisco Augusto Burkert Del Pino

Ivan Binachi

Luiz Francisco Machado Pfeifer

**Alunos Pós-Graduação:**

Ana Rita Tavares Krause (Doutoranda em Veterinária)

Bárbara Scherer (Residente em Clínica Veterinária)

Carolina Bessalho Jacometo (Doutoranda em Biotecnologia)

Camila Pizoni (Residente em Clínica Veterinária)

Claudia Demarco (Mestranda em Zootecnia)

Diego Andres Velasco Acosta (Doutorando em Veterinária)

Elizabeth Schwegler (Pós Doutoranda em Veterinária)

Josiane de Oliveira Feijó (Doutoranda em Veterinária)

Lais Fernanda Mielke (Mestranda em Zootecnia)

Leila Cardoso (Doutoranda em Zootecnia)

Lucas Teixeira Hax (Doutorando em Biotecnologia)

Luis Gustavo Crochemore da Silva (Mestrando em Biotecnologia)

Marcio Erpen Lima (Mestrando em Veterinária)

Marina Menoncin Wensche felder (Mestranda em Veterinária)

Paula Montagner (Doutoranda em Biotecnologia)

Pedro Augusto Silva Silveira (Mestrando em Veterinária)

Ruven Alves Pereira (Pós Doutorando em Veterinária)

Vinicius Tabeão (Doutorando em Biotecnologia)

**Alunos Graduação:**

Aline Marangon de Oliveira (Medicina Veterinária)

Andressa Stein Maffi (Medicina Veterinária)

Arthur de Castro Jorge e Silva (Biotecnologia)

Douglas Perazzoli (Medicina Veterinária)

Érica Ferri de Oliveira (Medicina Veterinária)

Fabiane Pereira de Moraes (Medicina Veterinária)

Fernanda Trindade da Rosa (Zootecnia)

Gabriela Bueno Luz (Medicina Veterinária)

Guilherme Nunes Bolzan (Medicina Veterinária)

Jéssica Halfen (Zootecnia)

Leandro Krenski da Silva (Medicina Veterinária)

Leila Cardozo (Doutoranda em Zootecnia)

Lucas Balinhas Farias (Medicina Veterinária)

Mityelle da Costa Chaves Rodrigues (Medicina Veterinária)

Patrícia Mattei (Ciências Biológicas)

Pelotas, Fevereiro de 2013.

## 1.Caracterização do Problema

---

As demandas do setor de produção leiteira têm influenciado o manejo da alimentação e os hábitos dos animais, que têm sido exigidos metabolicamente para cumprir com as necessidades produtivas dos estabelecimentos leiteiros (DILLON et al., 2005). Devido a esta intensificação nos sistemas de produção leite tem ocorrido um aumento no aparecimento de transtornos metabólicos nos rebanhos leiteiros. Uma vez que, o desafio metabólico imposto pela maior produtividade destes animais, favorece o desequilíbrio entre o aporte de nutrientes no organismo, capacidade de metabolização desses componentes e os níveis de produção alcançados, caracterizando um Balanço Energético Negativo (BEN) (FENWICK et al., 2008).

O BEN é caracterizado pelas últimas três semanas de gestação e três primeiras semanas de lactação. A demanda de nutrientes pelo feto e placenta atinge o nível máximo neste período, Grummer et al. (2009). No entanto, o consumo de matéria seca (CMS) diminui em 10 a 30% devido às concentrações de estrógeno no plasma que aumentam abruptamente (INGVARSTEN, 2006). As maiores concentrações de estrógeno no plasma têm sido relacionadas à inapetência dos ruminantes durante os últimos dias de gestação, podendo também influenciar maior mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo neste período, para suprir a demanda energética (GRUMMER, 2008), representando perda de escore de condição corporal, que segundo Chapinal (2012) é fator determinante para o maior intervalo parto/concepção.

A caracterização do BEN é de um aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (NEFA) na corrente sanguínea, em decorrência de mobilização de reservas corporais, junto com uma queda nos níveis de glicemia, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Estas alterações metabólicas levam a uma diminuição nos pulsos LH (hormônio luteinizante), necessários para estimular o desenvolvimento de folículos ovarianos e reduzindo também a resposta ovariana às gonadotrofinas. O atraso ou a baixa produção de esteroides nos ovários, estrógeno nos folículos e



progesterona após ovulação, promove atraso na involução uterina e o restabelecimento das funções ovarianas (Santos, 2005; Butler, 2004), ocorrendo um aumento do intervalo parto concepção e, com isto, comprometendo a lucratividade do sistema (LUCY, 2007).

Em rebanhos leiteiros, o adequado intervalo de parto/concepção é de 12 a 13 meses, (SANTOS, 2001), e está diretamente relacionado com a eficiência reprodutiva do rebanho. Para cumprimento desta meta e melhor eficiência da atividade reprodutiva, foram desenvolvidos protocolos para sincronizar a ovulação de vacas, permitindo a reprodução sem detecção de cio, e aumentando assim as taxas de serviço (VASCONCELOS et al., 1999, PURSLEY et al., 1995).

Para aperfeiçoar a utilização de inseminação artificial, foi desenvolvida a técnica de Inseminação Artificial a Tempo Fixo (IATF), que permite inseminação de 100% dos animais, sem a necessidade de detecção de cio, reduzindo a atividade de mão de obra e falhas na atividade prática de observação de cio (o que é um dos entraves para o sistema de produção), além de, induzir ciclicidade de vacas em anestro, e diminuição do intervalo entre partos (PATTERSON, 2006; SARTORI et al, 2006).

Atualmente, existem duas principais abordagens farmacológicas para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular durante os protocolos de sincronização de ovulação. A indução da ovulação do folículo dominante com gonadotrofinas (PURSLEY et al., 1995) ou a indução da atresia folicular com estrogênios e progesterona (SOUZA et al., 2009). Porém, mesmo vários estudos realizados com foco na reprodução de vacas leiteiras, a baixa eficiência reprodutiva continua sendo uma grande preocupação econômica para o sistema de produção de leite, havendo a necessidade de desenvolvimento de novas pesquisas nesta área.

Desta forma, trabalhamos com a hipótese de que protocolos de inseminação artificial em bovinos leiteiros a base do hormônio benzoato de estradiol pode ser utilizado como uma alternativa mais barata, obtendo taxas de concepção similares quando comparado ao hormônio GnRH. Além disto, a

administração de insulina humana injetável proporciona um melhor crescimento folicular final, aumentando as taxas de concepção em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo.

## **2.2 Objetivos e Metas**

---

### **2.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficiência reprodutiva de dois protocolos de sincronização de cio/ovulação, bem como o efeito da utilização da aplicação de insulina durante os protocolos sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras.

### **2.2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Comparar a eficiência de um protocolo de sincronização de cio a base de hormônio GnRH ou Benzoato de estradiol;
- 2) Avaliar a eficiência da aplicação de insulina humana no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras;
- 3) Avaliar a eficiência do uso de CIDR de 1º, 2º e 3º uso;

## **2.3 Metodologia**

---

### **Instalações**

O experimento será realizado em uma propriedade leiteira no sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E, a qual possui convênio firmado com a Universidade Federal de Pelotas para a realização de atividades de pesquisa.

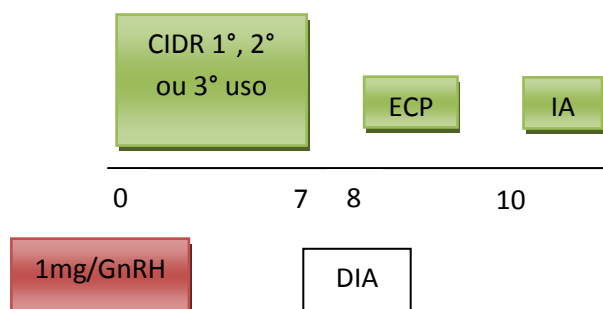
Os animais serão mantidos em sistema semi-extensivo de produção sob mesmas condições de manejo e alimentação.

## Animais

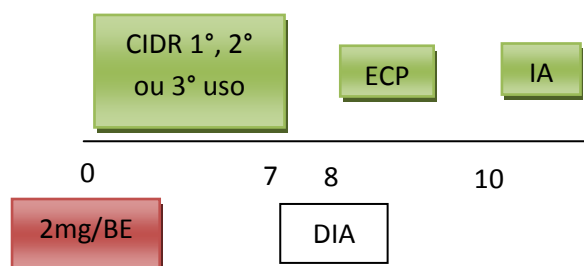
### Experimento 1.

Serão utilizadas 200 vacas a partir de 60 até 200 dias de lactação, com produção de leite e ordem de partos similares, sendo estas divididas aleatoriamente em dois grupos com diferentes protocolos de sincronização de cio/ovulação. No início do protocolo 1, o dia zero, que representa o início do protocolo, será a base de uso de hormônio GnRH, dose de 1mg/animal via intramuscular (IM), e inserção de dispositivo intravaginal de liberação controlada do hormônio progesterona (CIDR), que será reutilizado até 3º uso, sendo também fator considerado para análise. No dia sete, será retirado o dispositivo CIDR e aplicado 5mg/prostaglandina/animal, via IM. No dia oito, aplicação de hormônio cipionato de estradiol, e no dia dez, realização da inseminação artificial, com ou sem observação de cio (fig. 1), os animais que manifestarem cio antes deste período também serão inseminados, com intervalo de observação de cio/inseminação de 8-12 h. Para realização do protocolo 2, o dia zero será a base de hormônio benzoato de estradiol, na dose de 2mg/animal via IM, seguindo a partir daí como o protocolo 1. (fig 2). O manejo reprodutivo acontecerá nas terças feiras, após a ordenha dos animais, por tempo necessário, até atingir o número de animais proposto.

**Fig 1. Protocolo 1: Sincronização de cio/ovulação utilizando hormônio GNRH**



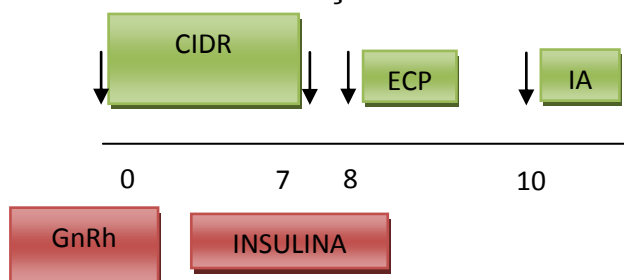
**Fig 2. Protocolo 2: Sincronização de cio/ovulação utilizando hormônio Benzoato de Estradiol**



### Experimento 2

Serão utilizadas 60 vacas a partir de 60 a 100 dias de lactação. O protocolo utilizado será com uso do hormônio GnRh e CIDR de primeiro uso (fig 3), sendo que no dia 7 do protocolo as vacas receberão uma aplicação subcutânea de 0,25 UI/Kg P.V de insulina humana recombinante (Novolin N- Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark).

**Fig 3. Protocolo de sincronização utilizando insulina exógena**



### Coletas das amostras

#### Experimento 1

A partir do dia zero do início do protocolo de sincronização de ovulação, serão coletadas amostras de sangue do complexo artério venoso coccígeo nos dias zero e sete durante o período de tratamento. Dados como, produção de leite, escore de condição corporal, dia da inseminação, manifestação de cio, diagnóstico de gestação também serão obtidos.

## **Experimento 2**

No dia 7, 9, 10 e 14 do protocolo de sincronização de ovulação, serão coletadas amostras de sangue do complexo artério venoso coccigeo, para realização de análises de níveis de progesterona, estrogênio, IGF 1, glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados, bem como avaliação ultrassonográfica das estruturas ovarianas, além de estimar escore de condição corporal.

### **Análises sanguíneas**

Serão realizadas análises das concentrações plasmáticas de Progesterona (P4) e IGF1, através do método radioimunoensaio, utilizando o kit coat-A-Count Progesterone (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Glicose sanguínea, mensurada através do método colorimétrico com Kits enzimáticos, conforme a metodologia indicada pelo fabricante, para leitura destes testes será utilizado espectrofotômetro de luz visível. As concentrações de Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE) serão mensuradas, sendo utilizado para este marcador o kit reagente Wako NEFA-HR<sup>®</sup>, em leitor de placas. Além destes, será realizada análises de insulina, através de imunoensaio enzimático, utilizando o kit comercial (INS-Easia KAP125, EUA).

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos deste experimento serão analisados no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA). As médias serão analisadas através do método MIXED MODELS, considerando o animal, o grupo e o momento da coleta. A comparação de médias individuais será feita através do teste de Tukey-Kramer. Médias pontuais serão analisadas através do método One-way ANOVA. A correlação entre as variáveis será feita através do coeficiente de correlação de Pearson. Serão considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

### **Infra-estrutura disponível**

---

Os procedimentos experimentais serão realizados junto ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC). Tal grupo mantém convênio com, Fazenda 4 Irmãos, Laboratório de Análise de Leite (Embrapa), Laboratório Regional de Diagnóstico (UFPEL), Laboratório de Patologia Clínica (UFPEL), Laboratório de Patologia Clínica (UFPEL), Laboratório de Bioquímica Aplicada (UFPEL), Hospital de Clínicas Veterinária (UFPEL) e, também, com o Centro de Desenvolvimento Tecnológico (UFPEL), Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do Departamento de Zootecnia – FAEM - UFPEL.

## **2.4 Resultados e Impactos esperados**

---

### **2.3.1 Científicas**

Espera-se determinar o efeito de diferentes protocolos utilizados na sincronização de cio de vacas leiteiras, bem como a interferência nas concentrações de P4, com utilização de CIDR de 1º, 2º e 3º uso, sobre a resposta a eficiência reprodutiva. Além disto, será avaliado o efeito de infusão de insulina em aplicação única junto ao protocolo. Elaboração de uma dissertação de mestrado e consequente publicação de um artigo científico completo em periódico indexado da área com considerado fator de impacto. Além da publicação de resumos em congressos de nível nacional e internacional.

### **2.3.2 Tecnológicas**

Ao final do projeto, espera-se determinar o melhor protocolo de sincronização de cio para vacas de leite, em termos de eficiência reprodutiva e mesmo econômica. Esta a definição é de extrema relevância, pois permitirá aos produtores ajustarem o controle de manejo reprodutivo com expectativas à produção e reprodução, bem como possíveis aumentos na taxa de concepção, reduzindo intervalo parto concepção, impactando diretamente na lucratividade de fazendas leiteiras.

## **2.4 Qualificação da equipe envolvida**

---

Este projeto está vinculado às linhas de pesquisa referente à Clínica Metabólica, nas quais já viemos desenvolvendo atividades dentro do grupo de pesquisa NUPEEC - Estudos em Metabolismo Animal (sob o código no COCEPE 52.75.10.34). Serão envolvidos orientados dos Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia, Medicina Veterinária e Zootecnia, bem como, estudantes de iniciação científica dos cursos de graduação em Biotecnologia, Medicina Veterinária e Zootecnia, nas atividades de pesquisa relacionadas ao projeto, sendo um importante instrumento de formação de recursos humanos.

Para execução deste projeto trabalharemos com uma equipe multidisciplinar, com a participação de pesquisadores/professores de nossa instituição.

## **2.5 Indicadores de resultados esperados ao final do projeto**

---

- Produzir uma dissertação de mestrado;
- Publicar pelo menos 1 artigo em revistas de circulação internacional e 1 nacional, classificadas na área de medicina veterinária como entre “A1” e “B1” no Sistema de Classificação de Periódicos, Anais e Revistas da CAPES;
- Divulgar os resultados em congressos da área em âmbito nacional e internacional;
- Divulgar os resultados em congressos da área em âmbito local e regional, tais como Congressos de Iniciação Científica e Encontros de Pós-graduação.

## Cronograma do Projeto

### Cronograma:

Tabela 1 – Lista de atividades a serem desenvolvidas durante a execução do projeto.

Atividades				
	2011	2012		2013
	2°	1°	2°	1°
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
Seleção dos Animais			X	
Avaliação clínica			X	
Avaliação zootécnica			X	
Coletas a campo			X	
Análises bioquímicas			X	
Infusão de insulina			X	
Análise estatística			X	X
Preparação de artigo				X
Submissão de artigo				X
Reuniões semanais	X	X	X	X



## **2.6 Aspectos Éticos (quando aplicável)**

---

Todos os procedimentos que serão realizados com os animais estarão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Após o término do experimento, todos os animais permanecerão na fazenda dando continuidade ao seu ciclo produtivo.

## 2.7 Referências Bibliográficas

- Albarrán-Portillo, B; Polott, G.E. The relationship between fertility and lactation characteristics in Holstein cows on United Kingdom commercial dairy farms. 2013. *J. Dairy Sci.* 96 :635–646
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 2004;82/83:479–86.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72.
- Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2003;78:307–26.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:449–457.
- Butler, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In anais do VII curso de novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, Uberlândia, 2004.
- Butler, W.R. Fertilità della bovina in lattazione in relazione alla fisiologia del periodo di transizione. Congresso Nazioale Multisala, SIVAR. 2010. Review. *Depart. Anim. Sci.*
- Carrick, M.J., Shelton, J.N., 1967. The synchronisation of oestrus in cattle with progestogen impregnated intravaginal sponges. *J. Reprod. Fertil.* 14, 21–32.
- Chapinal, N; Carson, M.E; Leblanc, S.J; Leslie, K.E; Godden, S; Capel, M; Santos, J.E.P; Overton, M.W; Duffild, T.F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 2012.
- Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Whittaker, P.R., Gavaga, Q.A., Wilde, R., Mapletoft, R.J., 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim. Repro. Sci.* 81, 25–34.
- Colazo MG, Bo GA, Illuminati H, Meglia G, Schmidt EE, Bartolome J. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology* 1999;51:404.
- Coleman D.A., Bartol F.F., Spencer T.E., Floyd J.G., Wolfe D.F., and Brendemuehl JP. Effects of a potent GnRH agonist and hormonal profiles, synchronization of estrus and fertility in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1991; 69(Suppl. 1): 396
- Casida, L. E. 1961. Present status of the repeat-breeder cow problem. *J. Dairy Sci.* 44:2323–2329.
- Dransfield, M. B., R. L. Nebel, R. E. Pearson, and L. D. Warnick. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81:1874–1882.
- Dillon, J., Morris, M., O'donnell, L., Reid, A., Rickinson, M, Scott, W. Engaging and Learning with the Outdoor Classroom- The Final Report of the Outdoor Classroom in a Rural Context Action Research Project. Slough: National Foundation for Educational Research. 2005.
- Fenwick, M.A., Llewellyn, S., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., Murphy, J.J., Patton, J e Wathes, D.C. Negative energy balance in dairy cows is associated with

specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reprod.* 135. 2008.

Grummer, R.R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 2008.

Grummer, M.A, Sullivan, J.A, Magness, R.R & Bird, I.M. Vascular endothelial growth factor acts through novel, pregnancy-enhanced receptor signalling pathways to stimulate endothelial nitric oxide synthase activity in uterine artery endothelial cells. *Biochemical Journal* 417 501–511. 2009.

Ingvarsen, K.L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*. v. 126, p. 175-213. 2006.

Loeffler, S. H., M. J. de Vries, and Y. H. Schukken. 1999. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2589–2604.

Lucy, M. C. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1635–1647.

Lucy, M.C. Reproductive lós in high-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *J. Dairy Sci.* 84:1277-1293.2001.

Lucy, M. C., G. A. Verkerk, B. E. Whyte, K. A. Macdonald, L. Burton, R. T. Cursons, J. R. Roche, and C. W. Holmes. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J. Dairy Sci.* 92:526–539

Lucy, M.C. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Reprod Suppl.* 64, 237-254. 2007.

Mapletoft, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J. Anim. Sci.* v.81,E. Suppl. 2, p.E28–E36, 2003.

McDougal S., Compton CWR., Annis FM. Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicle wave dynamics in anovulatory anoestrus post partum cattle. *Anim Reprod Sci* 2004;84:303-14

Moreira F., Orlandi C., Risco CA., Mattos R., Lopes F., Thatcher WW. Effects of presynchronisation and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001;84:1646- 59

Patton, J., D. A. Kenny, S. McNamara, J. F. Mee, F. P. O'Mara, M. G. Diskin, and J. J. Murphy. 2007. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 90:649–658.

Patterson, D. J. Revisão de sistema de sincronização do estro utilizando a progesterona oral Acetato de Melengestrol. In: *NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS.10.*, 2006, Anais...Uberlândia: CONAPEC Jr. 2006.

Pursley JR., Mee MO., and Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915–923.

- Santos, I. W. et al. Percentual de estro e taxa de gestação de vacas Nelore sincronizadas com CIDR-B. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, n. 3, p. 308-310, 2001.
- Rathbone, M.J., Macmillan, K.L., Bunt, C.R., Burggraaf, S., Burke, C., 1997. Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 363–392.
- Rathbone, M.J., Bunt, C.R., Ogle, C.R., Burggraaf, S., Macmillan, K.L., Burke, R., Pickering, K.L., 2002. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. *J. Control. Release* 85, 105–115.
- Santos, J. E. P. Efeitos da nutrição e do manejo periparto na eficiência reprodutiva de vacas de leite. In *anais do VIII curso de novos enfoques na produção e reprodução de bovinos*. Uberlândia, 2005.
- Sartori, R. et al. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 65, p. 1311-1321, 2006.
- Sartori, R., Rosa, G. J. M., Wiltbank, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2813-2822
- Schmitt, E. J., T. Diaz, M. Drost, and W. W. Thatcher. 1996. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.* 74:1084–1091.
- Stevenson, J. S. 2000. Are your cows cycling; if not why? *Hoard's Dairyman* 145:202–203.
- Stevenson JS., Tiffany SM., Lucy MC. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronising ovulation in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 2004;87:3298-305
- Souza F.A., Canisso I.F., Borges A.M., Vale Filho V.R., Lima A.L. & Silva E.C. 2009. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(2):61-65.
- Twagiramungu HL., Guilbault A., Proulx J, Villeneuve P., and Dufour JJ. Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on oestrus synchronisation and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.*1992; 70:1904
- Vasconcelos JLM., Silcox RW., Rosa GJ., Pursley JR., Wiltbank MC. Synchronisation rate, size of the ovulatory follicle and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the oestrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999;52:1067-1078

### 3 Relatório de trabalho de campo

#### 3.1 Local

Este estudo foi realizado em uma propriedade leiteira no sul do Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, nas coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' E, a qual possui convênio firmado com a Universidade Federal de Pelotas para a realização de atividades de pesquisa. Em atividade há 60 anos, a propriedade compreende quatro diferentes setores produtivos, plantações de arroz e soja, rebanho de gado de corte e leite, com 197 funcionários fixos. A região é de clima subtropical ou temperado, com temperatura média no verão de 28° e no inverno de 5°, com precipitação média anual de 1.196mm/ano.

#### 3.2 Animais, dieta e manejo

O período do estudo a campo foi de agosto a dezembro de 2012, com vacas multíparas e primíparas da raça holandês de um rebanho médio de 900 animais em lactação, mantidas em sistema semi extensivo, com produção média de 28 litros/leite/animal/dia em duas ordenhas diárias, com intervalo de 12 h. Os animais foram selecionados pelos dias após o parto, as vacas que se encontravam entre 60 a 160 dias pós-parto, e foram aleatoriamente distribuídas nos dois grupos de protocolos de sincronização de cio/ovulação. O manejo reprodutivo da propriedade é realizado uma vez por semana, portanto, semanalmente as vacas foram inseridas nos tratamentos durante o período de estudo, totalizando 230 animais até os 160 dias de lactação.

A alimentação do período pré-parto consistiu de dieta a pasto e suplementação de dieta aniônica e após o parto, dieta concentrada para vacas em lactação e pastagens cultivadas, as quais recebiam após a ordenha. Imediatamente após o parto os animais eram transferidos para o lote colostro, e permaneciam neste por 14 ordenhas, após este período são distribuídos em lotes de primíparas e multíparas de maior ou menor produção de leite.

### 3.3 Protocolos de sincronização de cio/ovulação

#### 3.3.1 Experimento GnRH ou BE

Dois tratamentos de sincronização de cio/ovulação foram utilizados no protocolo. No primeiro dia de protocolo, chamado dia zero, os animais recebiam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR®; Pfizer Saúde Animal, Brasil), concomitantemente com a aplicação i.m. de 25 µg de lecirelina (GnRH; Gestran Plus®, Tecnopec, Brasil). No Dia 7 foi realizada a remoção do CIDR, seguido da injeção i.m. de 25 mg de um análogo da prostaglandina F<sub>2</sub>α (PG; Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Brasil). No dia 8, foi realizada uma aplicação i.m. de 1 mg de cipionato de estradiol (CE; ECP®, Pfizer Saúde Animal, Brasil) e 48 horas depois realizada a inseminação dos animais que não foram observados em estro. Animais observados em estro entre os dias 7 e 9 do protocolo eram inseminados 12 horas após a detecção. O diagnóstico de gestação (DG) foi feito aos 32±3 dias pós-IA, através de ultrassonografia transretal e confirmação da gestação 30 dias após o primeiro DG (62±5). Animais não prenhes nos DG de 30 e 60 dias eram resincronizados.

O outro protocolo difere somente pela aplicação de Benzoato de estradiol ao invés do GnRH no momento da inserção do dispositivo liberador de progesterona.

##### 3.3.1.1 Coleta de amostras e análises

Nos dias zero e sete do protocolo de sincronização de cio, foram coletadas amostras de sangue do complexo coccídeo, através de sistema *vacutainer*. As amostras foram processadas no laboratório de Bioquímica da Universidade para separação e armazenamento do soro para posterior análise. Todas as análises serão realizadas no mesmo laboratório, com exceção da análise de progesterona e estradiol, que será realizada através de radioimunoensaio em laboratório da cidade de São Paulo.

## 4 Artigo

### Preparado para ser submetido à revista *Theriogenology*

#### **Uso de Benzoato de estradiol no início do protocolo Heat Synch em vacas da raça holandês lactantes**

*Laís F. Mielke<sup>1,3</sup>; Márcio Lima<sup>1,3</sup>; Diego V. Acosta<sup>1,3</sup>; Augusto Schneider<sup>1,3</sup>; Francisco A. B. Del Pino<sup>1,3</sup>; Márcio N. Correa<sup>1,3</sup>; Eduardo G. Xavier<sup>1,2</sup>; Jéssica Halfen<sup>1,3</sup>; Cássio C. Brauner<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

<sup>2</sup>Granjas 4 Irmãos S.A.

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

#### **Resumo**

O objetivo do estudo foi avaliar dois tratamentos indutores de ovulação para protocolo Heat Synch, utilizando também dispositivo de progesterona de até 3º utilização (CIDR) para cada tratamento. Para o estudo foram utilizadas 230 vacas da raça holandês multíparas (n=120) e primíparas (n=110), as quais foram divididas em dois tratamentos de protocolos de sincronização de cio/ovulação. No dia 0 do protocolo as vacas receberam GnRH (n=120) ou BE (n=110), junto com a inserção de um CIDR de 1, 2 ou 3 uso, sendo também uma variável de análise. No dia 7 o CIDR foi removido e prostaglandina administrada. No dia 8 as vacas receberam uma injeção de ECP, sendo inseminadas por observação de cio, ou em tempo-fixo (dia 10). O diagnóstico de

gestação foi realizado entre os dias  $30 \pm 2$  pós inseminação artificial (IA). As taxas de concepção não diferiram entre os tratamentos com GnRH ou BE ( $P=0,86$ ). A taxa de concepção entre os diferentes usos de CIDR também não diferiu para o grupo BE ( $P=0,58$ ) bem como para o grupo GnRH ( $P=0,36$ ). Quando comparada a manifestação de cio entre os grupos BE e GnRH não houve diferença ( $P=0,18$ ) e entre primíparas e múltíparas ( $P=0,23$ ). Conclui-se que o hormônio BE pode substituir o GnRH no início do protocolo de sincronização, e a reutilização do CIDR não afetou as taxas de concepção neste estudo.

Palavras chave: GnRH, BE, cio, concepção



## **Introdução**

O progresso na seleção genética na pecuária leiteira objetivando um aumento na produtividade individual por animal está intimamente ligado com a eficiência reprodutiva, onde segundo relatado por Butler (2010) houve um declínio nas taxas de concepção de 25% desde o ano de 1951 até 2007. Além do fator nível de produção estar relacionado negativamente com a eficiência reprodutiva, no período de transição, de gestante para lactante, a vaca encontra-se em balanço energético negativo (BEN). Caracterizado por um desequilíbrio entre os nutrientes consumidos através da alimentação e a exigência do organismo animal, com consequente queda nos níveis de insulina circulante (SCARAMUZZI et al., 2006). Desta forma, alta produção de leite, BEN está associado ao atraso no retorno à atividade ovariana pós-parto e, conseqüentemente, um atraso no momento da primeira ovulação e concepção (BUTLER, 2000).

Protocolos hormonais para a indução de estro e ovulação em vacas durante o pós-parto são estratégias que visam maximizar índices relacionados à fertilidade, através do controle à exposição à progesterona, crescimento e ovulação do folículo dominante (MAPLETOFT et al., 2003). Diversos programas são utilizados em protocolos de inseminação de bovinos leiteiros, havendo variação quanto à utilização de tipos diferentes de hormônios, momento da utilização e intervalo dos mesmos, bem como o momento da IA (RABIEE et al., 2005). Quando administrado junto com um progestágeno, o estradiol provoca atresia do folículo dominante, dando início a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (McDougal et al., 2004) já o GnRH promove a ovulação do folículo dominante e início de uma nova onda folicular (BÓ et al., 2002). Os progestágenos objetivam controlar o ciclo estral para inseminação artificial de bovinos e ovinos (CARRICK e SHELTON, 1967). Comercialmente os

dispositivos tem recomendação de apenas uma utilização, a reutilização deste, é tema de diversos estudos principalmente em bovinos de corte (COLAZO et al., 2004; CERRI, 2005) porém não há informações sobre a eficácia na reutilização dos progestágenos em bovinos de leite.

Sendo assim, o experimento foi realizado com objetivo de comparar a eficiência de dois protocolos de IATF, variando-se o hormônio utilizado para a sincronização da emergência da onda folicular (BE ou GnRH), bem com a reutilização de CIDR de até 3° uso em bovinos de leite;

## **Materiais e Métodos**

### **Desenho experimental**

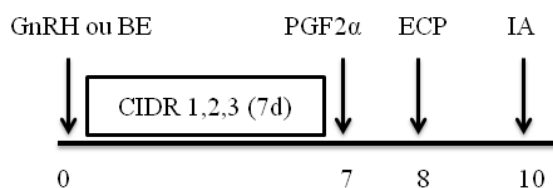
O estudo foi desenvolvido em uma propriedade localizada no sul do Rio Grande do Sul, (32° 16' S, 52° 32' O) entre os meses de julho de 2012 a dezembro de 2012. Com aprovação do Comitê de Ética e Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 2358. Para o estudo foram utilizadas 230 vacas primíparas e múltíparas da raça Holandês, entre 60 e 165 dias de lactação, com média de produção de leite de  $28 \pm 3,4$  kg/dia. Os animais eram mantidos em sistema de criação semi-extensivo, com suplementação concentrada após cada ordenha, que era realizada duas vezes ao dia, com intervalo de 12 h.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois diferentes tratamentos para o protocolo de sincronização de cio/ovulação de acordo com o hormônio utilizado no início do protocolo de sincronização de cio/ovulação. A variação entre os grupos ocorreu no início do protocolo (Dia 0), onde as vacas receberam duas abordagens farmacológicas diferentes (GnRH ou BE) para sincronização da emergência de uma

nova onda folicular. No grupo BE, foi utilizado 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (RIC-BE, Tecnopec, São Paulo, Brasil), já no grupo GnRH, foi aplicado 25 µg de leirelina (Gestran Plus<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil). No dia zero do protocolo, foi inserido um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona controlada (CIDR<sup>®</sup>; Pfizer Saúde Animal, Brasil), contendo 1,9 g de progesterona, o qual foi reutilizado até o 3º uso, sendo também este fator considerado para análise. Desta forma, animais do grupo BE, receberam, CIDR de 1º, 2º e 3º uso, do mesmo modo no grupo GnRH.

Sete dias após (Dia 7), o CIDR era retirado e aplicado 25 mg de prostaglandina i.m. (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Brasil). No Dia 8 do protocolo, aplicava-se 1 mg de cipionato de estradiol i.m. (ECP<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Brasil) conforme a figura 1. Os animais observados em cio eram inseminados 12 horas após e no dia 10 era realizada a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) daqueles animais não observados em cio. A observação de cio era realizada duas vezes ao dia, por técnico devidamente treinado, do momento da retirada do CIDR até o dia 10.

Fig 1. Protocolo de sincronização de cio/ovulação, experimento 1.



### Exames ultrassonográficos

Os exames ultrassonográficos, com ultrassom Weld 3000, sonda transretal linear de 5 MHz, para diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 a 35 dias após a inseminação artificial.

### **Análise Estatística**

As análises foram realizadas considerando o total de animais, bem como entre grupos de primíparas e multíparas submetidas aos diferentes tratamentos, considerando os hormônios utilizados e tipo de CIDR usado. Os dados obtidos deste experimento foram analisados no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA), através do teste de qui quadrado, considerando valores significativos de  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

Dentre as 230 vacas, a taxa de concepção foi semelhante entre os tratamentos GnRH (51,4%, 38/120) e BE (48,6%, 36/110) ( $P=0,86$ ). Porém houve diferença ( $P < 0,000003$ ) quando comparado as taxas de concepção em IATF (13,5%, 10/80) e IATF com demonstração de cio (86,5%, 64/150). Desta forma foi avaliado a taxa de exteriorização de cio do total de vacas sincronizadas ( $n=230$ ) nos diferentes tratamentos, sendo de (69,2%, 83/120) para o grupo que recebeu GnRH e 60,9%, 67/110) para o que recebeu BE no início do protocolo ( $P=0,18$ ). A demonstração de cio entre primíparas 50,7% ( $n=110$ ) e multíparas 49,3% ( $n=120$ ) não foi diferente ( $P=0,23$ ).

A utilização de CIDR de 1º, 2º e 3º uso, não afetou as taxas de concepção, sendo de 36,5% (27/92), 28,4% (21/61) e 35,1% (26/77), respectivamente ( $P=0,75$ ). Quando avaliada a interação da utilização de CIDR com o uso de BE ou GnRH no início do protocolo os resultados de taxa de concepção não demonstraram diferença entre os diferentes tratamentos. CIDR 1, 2, 3 uso para o tratamento BE respectivamente, 30,9% ( $n=17/55$ ), 36,6% ( $n=15/41$ ), 40,9% ( $n=18/26$ ) ( $P=0,58$ ). CIDR 1, 2, 3 uso para o

tratamento GnRH respectivamente, 31,4% (n=16/51), 45,5% (n=20/44), 38,2% (n=21/55) (P=0,36). Houve diferença no DG 60 entre vacas que manifestaram cio e vacas IATF (P= 0,000001), ou seja, 38,7% (n=58/150) dos animais que demonstraram cio apresentaram prenhez ao DG de 60 dias, contra 7,5% (n=6/80) para os animais que não demonstraram cio no protocolo de IATF.

### **Discussão**

O manejo reprodutivo de bovinos de leite é comprometido devido a falhas da detecção de cio. Para minimizar este efeito negativo, os programas de IATF permitem a indução da ovulação sem a ocorrência de manifestação cio (THATCHER et al., 2010). O estradiol exógeno, administrado junto com o progestágeno, provoca atresia do folículo dominante, quando administrado antes ou durante a emergência da onda, suprimindo FSH e LH (MCDUGAL et al., 2004). Nossos resultados demonstram que as taxas de concepção não foram afetadas utilizando o BE no início do protocolo em comparação ao tratamento com GnRH. Trabalho semelhante foi realizado por Vasconcelos et al., (2011) com vacas da raça holandesa, onde também foi observado que não há diferença na taxa de concepção dos dois protocolos de IATF, com a utilização de GnRH ou BE. Quando comparado os tratamentos GnRH e BE em bovinos de corte, os resultados de taxas de concepção também não diferiram entre os dois fármacos (SILVEIRA et al., 2011).

Confirmando nossa hipótese, a reutilização do dispositivo CIDR, mostrou ser eficiente até o 3º uso, sem afetar as taxas de concepção. Quanto à reutilização do CIDR, Dias et al. (2009) realizaram um estudo, verificando a eficiência na utilização de CIDR de 1º, 2º e 3º uso em novilhas da raça nelore, no qual as taxas de concepção não foram diferentes entre os grupos. Do mesmo modo Colazo et al., (2004) não observaram

diferença nas taxas de prenhes na IA de bovinos sincronizados com CIDR de primeiro ou segundo uso. Concordando (Cerri, 2005) comparou as concentrações de P4 de um CIDR novo e reutilizado em vacas de leite, e observou que em ambos os níveis aumentaram imediatamente após a inserção do dispositivo e permaneceram com níveis de >1 ng/ml por todo período de uso. Com base nos dados dos demais estudos, confirmamos a hipótese do presente trabalho.

### **5. Conclusão geral**

A utilização do BE no momento da inserção do CIDR em protocolos de IATF para bovinos de leite, mostrou-se ser uma alternativa comparável ao GnRH considerando as taxas de concepção. Da mesma maneira a reutilização do CIDR demonstrou ser eficiente até o terceiro uso, sem alterar as taxas de concepção.

## REFERÊNCIAS

- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for selfappointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:449–457.
- Butler, W.R. Fertilità della bovina in lattazione in relazione alla fisiologia del periodo di transizione. *Congresso Nazioale Multisala, SIVAR.* 2010. Review. *Depart. Anim. Sci.*
- Carrick, M.J., Shelton, J.N., 1967. The synchronisation of oestrus in cattle with progesterone impregnated intravaginal sponges. *J. Reprod. Fertil.* 14, 21–32.
- Cerri, R.L.A., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G.S., Santos, J.E.P., 2005. Progesterone (P4) concentrations and ovarian response after insertion of a new or a 7-day used intravaginal P4 insert (IPI) in proestrus lactating cows. *J. Anim. Sci.* 83 (Suppl. 1), 37.
- Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Whittaker, P.R., Gavaga, Q.A., Wilde, R., Mapletoft, R.J., 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 25–34.
- Dias, C.C; Wechsler, F.S; Day, M.L; Vasconcelos, J.L.M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2a treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology, Science Direct.*2009.
- Gong, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicles development in cattle : practical implications. *Domestic Animal Endocrinology*, v 23, n.1-2. 2002.
- McDougal S., Compton CWR., Annis FM. Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicle wave dynamics in anovulatory anoestrus post partum cattle. *Anim Reprod Sci* 2004;84:303-14
- Mapletoft, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J. Anim. Sci.* v.81,E. Suppl. 2, p.E28–E36, 2003.
- Rabiee, A. R; Lean, I. J; Stevenson, M. A. Efficacy of Ovsynch Program on Reproductive Performance in Dairy Cattle: A Meta-Analysis. 2005. *J. Dairy Sci.* 88:2754–2770.
- Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Munoz-Gutierrez M. & Somchit A. 2006. A review of the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nut. Develop.* 46(4):339-354.

Silveira, P.A; Martins, M.C; Gabriel Filho, L.R.A; Castilho, C. Diâmetro folicular e taxa de prenhez em protocolo de sincronização com GnRH ou Benzoato de Estradiol no dia 0 em vacas de corte. *Colloquium Agrariae*, v. 7, n.2 Jul-Dez. 2011, p. 20-26. DOI: 10.5747/ca.2011.v07.n2.a070

Thatcher, W. W., J. E. P. Santos, F. T. Silvestre, I. H. Kim, and C. R. Staples. 2010. Perspective on physiological/endocrine and nutritional factors influencing fertility in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45:2–14.

Vasconcelos, J. L. M; Jardina, D. T. G; Sá Filho, O. G; Aragon, F. L; Veras, M. B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropinreleasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. 2011. *Theriogenology* 75 (2011) 1153–1160