

## Influência da estimulação do crescimento folicular na fertilidade de vacas de corte tratadas com eCG ou FSH em protocolos de IATF

Influence of Follicular Growth Stimulation on Fertility of Beef Cows Treated with eCG or FSH in FTAI Protocols

Diego Xavier Thedy, Carolina Gabriela Becker Berlitz, Carolina Rodrigues Oliveira, Débora Schneid Vaz Luiz, Gabriella dos Santos Velho, André Gustavo Cabrera Dalto & João Batista Souza Borges

### ABSTRACT

**Background:** The pregnancy rate in fixed-time insemination (FTAI) programs in beef cattle is affected by several factors, including the size of ovulatory follicle (OF). Induced ovulation of small OF ( $\leq 11$  mm) reduces the chance of pregnancy after FTAI when compared to ovulation of larger follicles ( $\geq 12$  mm). Hormonal treatments to enhance the follicle growth have been widely used in commercial beef cattle systems, aiming to improve the development of a dominant follicle. The objective of this experiment was to evaluate the effect of treatment with eCG or FSH at the time of progesterone implant removal on the diameter of OF, final follicle growth and pregnancy rate in beef cows.

**Materials, Methods & Results:** Three hundred and seven suckled beef cows with body condition score  $2.80 \pm 0.24$  (1 to 5 scale) and 45 to 70 days postpartum were synchronized to FTAI. On day 0, intravaginal implants containing 1 g of progesterone, were inserted and administered 2 mg of estradiol benzoate (EB), i.m. On day 7, intravaginal implants were removed and 150  $\mu$ g of D-cloprostenol were administered i.m. At this time, three groups were assigned according to the treatments: eCG (400 UI eCG, i.m.), FSH (25 UI FSH, i.m.) and Control (1 mL Saline, i.m.). On day 8, all cows were injected with 1mg EB i.m. and were inseminated 52 to 56 h after the implant removal. Transrectal ultrasonography exams of ovaries were performed at the time of implant removal and before FTAI to determine the diameter of the largest follicle and the follicular daily growth. Pregnancy exams were conducted by transretal ultrasonography 30 days after FTAI. Statistical analyzes were performed by Chi-square test for pregnancy rate. Ovarian diameters and follicular daily growth were analyzed by ANOVA with means compared by Tukey test considering significant  $P$  value  $< 0.05$ . The diameter of the largest follicle measured on day 7 (10.07, 9.64 and 10.36 mm) and on day 9 (12.73, 11.53 and 12.57 mm), to eCG, FSH and Control respectively, did not differ within treatments ( $P > 0.05$ ). Final follicular growth was greater ( $P < 0.05$ ) on eCG group (1.33 mm/day) compared to Control (1.1 mm/day) and FSH (0.94 mm/day). The pregnancy rates of FTAI were 56.6% (60/106), 52% (51/98) and 50.4% (52/103) to eCG, FSH and Control, respectively, with no statistic difference ( $P > 0.05$ ).

**Discussion:** Suckled beef cows managed under grazing systems frequently have reduced follicular development and longer postpartum anestrous. In this situation, protocols to FTAI combining progesterone, estradiol and eCG or FSH at the time of progesterone device removal are encouraged to improve final follicular growth, ovulation and to increase conception rate. The hypothesis of similar follicular growth and pregnancy rate in suckled beef cows treated with eCG or FSH was not confirmed in the field trial. eCG treated cows had greater follicular growth, follicular diameter at day 9 and higher pregnancy rate compared to FSH and Control cows. FSH produced similar follicular growth rates to Controls and both were significantly smaller than observed in cows receiving eCG. Also FSH supplementation failed to enhance pregnancy rate compared to Control cows. The longer half-life of eCG and its greater LH-like effects could explain the difference in final follicular stimulation when compared to FSH in FTAI protocols. Thus, administration of a single dose of FSH at progesterone device removal failed to be an alternative to eCG in FTAI synchronization programs.

**Keywords:** fixed time AI, beef cow, eCG, FSH.

**Descritores:** inseminação artificial a tempo fixo, vaca de corte, eCG, FSH.

DOI: 10.22456/1679-9216.83161

Received: 19 January 2018

Accepted: 4 June 2018

Published: 28 June 2018

Unidade de Reprodução de Bovinos, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: J.B.S. Borges [joao.borges@ufrgs.br - Tel.: +55 (51) 3308-6969]. Unidade de Reprodução de Bovinos, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Av. Bento Gonçalves n. 9090. Bairro Agronomia. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

## INTRODUÇÃO

O sucesso dos programas de inseminação artificial a tempo fixo (IATF) depende do crescimento do folículo ovulatório (FO) e do controle da ovulação [1]. Na etapa final do processo que precede a ovulação, o crescimento folicular está associado à maturação do oócito e, conseqüentemente, a sua capacidade fecundante [18]. As relações entre o tamanho do FO, formação do corpo lúteo, a produção de progesterona e o desenvolvimento embrionário inicial estão associadas ao estabelecimento da prenhez em novilhas e vacas de corte [2,11,19]. Diversos estudos relacionam o menor diâmetro do FO em vacas de corte sincronizadas para a IATF com a baixa condição nutricional, com a amamentação e com o intervalo parto-tratamento [4,5,10,11,13].

Esses fatores podem ser explicados devido à ovulação de um oócito imaturo, que compromete a fertilização e sobrevivência embrionária, estando também associados à baixa produção e liberação de estradiol pelo FO [9,18]. O uso de eCG [1,6,12] ou FSH [16,17] no final do tratamento para a sincronização do estro e da ovulação para IATF tem como objetivos: promover maior crescimento folicular, maior produção de estradiol e a maturação do oócito.

Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento final do FO em vacas de corte tratadas com eCG ou com FSH em protocolos de sincronização de estros e sua relação com taxa de prenhez em programas de IATF. A hipótese testada foi de que a aplicação de eCG ou de FSH apresentaria efeitos similares na estimulação do crescimento folicular final, na ovulação e na concepção de vacas de corte.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local

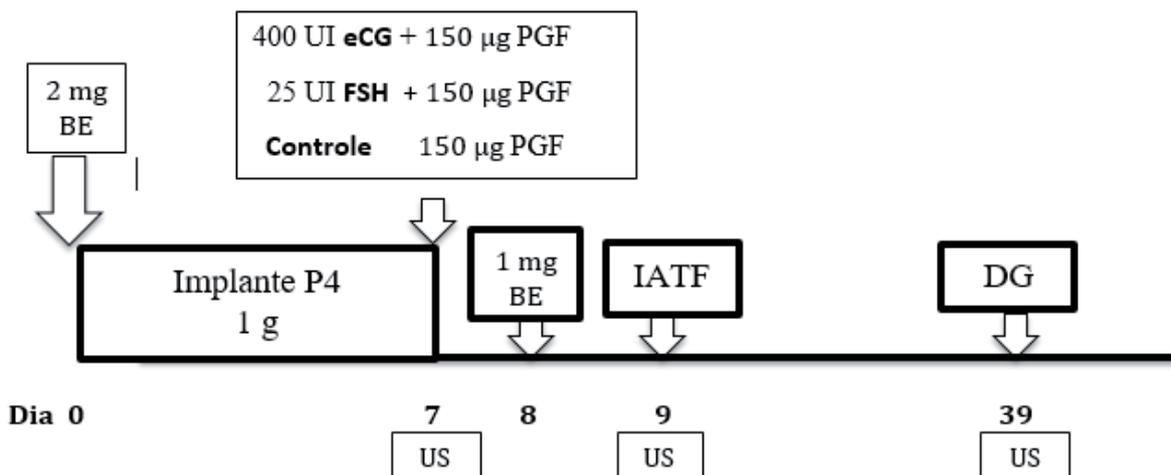
O experimento foi realizado em um estabelecimento comercial de gado de corte no estado do Rio Grande do Sul, localizado na região Litoral, que explora um rebanho de corte composto por vacas da raça Angus.

### Animais

Ao início do protocolo de sincronização do estro e ovulação, as vacas (n = 307) apresentavam um intervalo parto-tratamento variando entre 45 e 70 dias, escore de condição corporal (ECC) médio de  $2,80 \pm 0,24$  (escala 1-5) e taxa de ciclicidade ovariana de 45,6% (140/307). As vacas foram mantidas em pastagens nativas, suplementadas com sal mineral e livre acesso à água, garantindo um moderado ganho de peso entre o início dos tratamentos e o diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF (ECC =  $2,95 \pm 0,16$ ).

### Tratamentos

No dia 0, foi inserido um implante intravaginal contendo 1 g de progesterona (DIB®)<sup>1</sup>, juntamente com uma injeção de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®)<sup>1</sup>, i.m. Sete dias depois, os implantes foram removidos e 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan®)<sup>2</sup> foram administrados i.m. Neste momento, as vacas foram aleatoriamente destinadas a receber a terapia hormonal com eCG (Novormon®)<sup>1</sup> na dose de 400 UI, i.m. (eCG, n = 106); FSH (Pluset®)<sup>2</sup>, 25 UI, i.m., (FSH, n = 98); ou 2 mL de solução salina, i.m. (Controle, n = 103). Vinte e quatro h depois, todas as vacas receberam



**Figura 1.** Diagrama dos tratamentos e exames ultrassonográficos. BE: Benzoato de estradiol; eCG: Gonadotrofina Coriônica Equina; FSH: Hormônio foliculo-estimulante; PGF: Prostaglandina F2 alfa; P4: Progesterona; IATF: Inseminação artificial a tempo fixo; US: Exame ultrassonográfico.

uma aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol, i.m. A IATF foi realizada no dia 9, entre 52 e 56 h após a retirada do implante de progesterona.

*Exames ultrassonográficos*

Para a avaliação das estruturas ovarianas e diagnóstico precoce de gestação, foi utilizado ultrassom (Chison 8300 Digital)<sup>3</sup> equipado com transdutor retal linear de 5.0 MHz. Nos dias 7 e 9, subgrupos de vacas dos tratamentos eCG, (n = 37), FSH (n = 34) e Controle (n = 25), foram examinadas por ultrassonografia para a determinação do diâmetro do maior folículo presente através do cálculo da média de duas medidas perpendiculares. A taxa de crescimento folicular diário foi calculada pela diferença entre as medidas dos diâmetros foliculares do dia 7 e 9, dividida por dois e expressa em mm/dia. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF (Figura 1).

*Análise estatística*

A análise estatística foi realizada por Chi-quadrado para a taxa de prenhez. Para os dados referentes aos diâmetros dos folículos dominantes nos dias 7 e 9,

assim como a taxa de crescimento diário foi realizada análise de variância. Para a comparação das médias dos grupos foi utilizado o Teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos, resultados de  $P < 0,05$ . Para realização das análises estatísticas foi utilizado o *software* SPSS 18 for Windows.

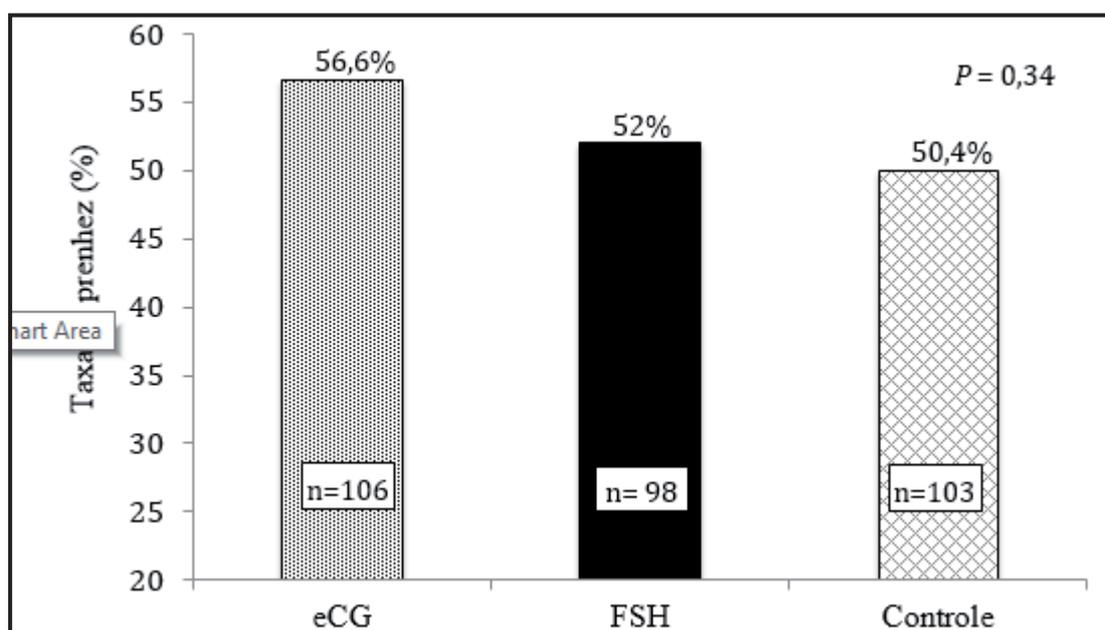
**RESULTADOS**

Os diâmetros médios e desvios-padrão dos folículos nos dias 7 e 9, bem como os valores calculados para as taxas de crescimento folicular diário estão apresentadas na Tabela 1. Os diâmetro dos folículos dominantes determinados no dia 7 não apresentaram diferença entre os três grupos ( $P > 0,05$ ), apresentando uma variação entre 5,5 e 16,6 mm. No dia 9, os diâmetros dos folículos ovulatórios das vacas tratadas com eCG foram numericamente maiores do que os encontrados nos grupos FSH e Controle ( $P = 0,06$ ). Foi observada maior taxa de crescimento folicular diária (Tabela 1) no grupo de vacas tratadas com eCG ( $1,33 \pm 0,56$  mm/dia),  $P < 0,05$ , mas valores semelhantes para os grupos Controle ( $1,10 \pm 0,61$  mm/dia) e FSH

**Tabela 1.** Médias e desvios padrão dos diâmetros foliculares determinados nos dias 7, 9 e taxas de crescimento diário do folículo ovulatório (FO) em vacas de corte tratadas com eCG, FSH e Controle.

	eCG (n = 37)	FSH (n = 34)	Controle (n = 25)
Diâmetro FO Dia 7 (mm)	10,07 ± 2,07	9,64 ± 1,86	10,36 ± 2,29
Diâmetro FO Dia 9 (mm)	12,73 ± 2,51	11,53 ± 1,95	12,57 ± 1,97
Taxa de crescimento diário (mm/dia)	1,33 ± 0,56 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,61 <sup>a,b</sup>

<sup>a,b</sup>Letras sobrescritas na linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Taxas de prenhez de vacas de corte em lactação tratadas com eCG, FSH e Controle em programas de sincronização do estro e da ovulação para IATF.

( $0,94 \pm 0,53$  mm/dia). De acordo com os resultados, não houve diferença significativa nas taxas de prenhez entre os grupos eCG e FSH e Controle (Figura 2).

#### DISCUSSÃO

No presente estudo, o tratamento com eCG promoveu maior taxa de crescimento folicular entre a retirada da fonte de progesterona e a IATF, em relação ao tratamento com FSH, no entanto, não foi observada diferença significativa nas taxas de prenhez. Desta forma, os resultados não sustentaram a premissa de que a administração de FSH promoveria um desenvolvimento folicular, semelhante ao tratamento com eCG e superior ao grupo Controle.

Segundo vários autores, o tamanho do folículo ovulatório pode afetar a taxa de prenhez à IATF [7,8,11,19]. Além disto, o maior tamanho do FO está correlacionado com a concentração sérica de estradiol, a manifestação de estro, a taxa de ovulação e com o sucesso na concepção [11]. A indução da ovulação de folículos dominantes pequenos, com diâmetro menor que 11 mm, está associada a menores taxas de prenhez e maiores perdas gestacionais em novilhas [11] e vacas de corte [14,15]. Novilhas que apresentam folículos menores que 10,7 mm ou maiores que 15,7 mm no momento da inseminação possuem menor chance de conceber quando comparadas àquelas com FO de 12,8 mm de diâmetro na IA [13]. Em vacas *Bos indicus*, Sales *et al.* [16] demonstraram haver associação positiva entre FO grandes, maiores que 14 mm, e a taxa de prenhez à IATF. Segundo os autores, o diâmetro folicular menor que 11 mm parece ser um limitante para a ocorrência da ovulação e para no estabelecimento da prenhez.

Apesar dos grupos não apresentarem diferença significativa no diâmetro do FO no dia 9, o grupo eCG apresentou maior taxa de crescimento diário, porém, as taxas de prenhez entre os grupos eCG, FSH e Controle não diferiram ( $P > 0,05$ ). No entanto, Perry *et al.* [11] relataram que o sucesso no estabelecimento da prenhez em vacas de corte submetidas a IATF não depende apenas diâmetro do FO, mas também é condicionado pela maturidade fisiológica do oócito ovulado.

O maior tamanho do FO está relacionado com a formação de CL de maior tamanho e maior produção subsequente de progesterona, fator que atua positivamente no desenvolvimento embrionário inicial e no reconhecimento materno da gestação [2,11]. O desenvolvimento de um FO pequeno também está associado

a reduzida concentração sérica de estradiol durante o período peri-ovulatório e menores níveis de progesterona durante a fase luteal subsequente [9,11,19]. O aumento nas concentrações séricas de estradiol é um indicativo de maior maturidade fisiológica do FO e, no momento da ovulação, desempenha um importante papel nos eventos relacionados ao estabelecimento da prenhez [11,15].

Apesar do maior tamanho do FO e maior taxa de prenhez no grupo tratado com eCG, em relação aos grupos FSH e Controle, estas diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ). Entre as possíveis causas para estes resultados, pode-se considerar que a boa condição corporal das vacas no período experimental influenciou positivamente tanto ao grupo de fêmeas tratadas com FSH como as não tratadas. Resultados semelhantes a estes foram relatados por Bó *et al.* [3] que atribuíram maiores taxas de prenhez em vacas com baixo escore de condição corporal tratadas eCG quando comparadas com as não tratadas. Ainda segundo estes autores, entre os benefícios da administração do eCG em vacas de corte com baixa condição corporal estão a redução do anestro no pós-parto, maior crescimento folicular, maiores taxas de ovulação e de concepção. De outra forma, em rebanhos com melhor manejo e condição nutricional, este efeito positivo do eCG tende a não ser evidenciado [1,16].

O ECC médio dos animais utilizados avaliado no início da sincronização de estro (dia 0) foi  $2,80 \pm 0,24$  e no momento do diagnóstico de gestação (dia 39) de  $2,95 \pm 0,16$ , indicando, que as vacas mantiveram ou ganharam peso durante o período experimental. Segundo Sá Filho *et al.* [15], pode haver um aumento significativo na taxa de prenhez de vacas lactantes tratadas com eCG, mesmo com ECC acima de 3,1 (escala de 1 a 5).

Deve-se considerar também que, neste experimento, não foi realizado o desmame temporário dos terneiros entre a retirada do implante e a IATF. O desmame por 48 h é normalmente recomendado para alcançar-se uma elevação de 5 a 10% na taxa de prenhez, quando comparada com os protocolos sem desmame temporário. Barreiros *et al.* [1] relataram que tanto o tratamento com eCG como o desmame temporário por 48 h pode influenciar de maneira similar o crescimento folicular e a taxa de ovulação em vacas Nelore acíclicas. O desempenho reprodutivo dos programas de IATF com desmame temporário pode variar dependendo da ciclicidade ovariana das vacas, do intervalo parto-tratamento e do ECC [4,16]. As

taxas de prenhez encontradas neste estudo, entre 50 e 56,6%, foram semelhantes às descritas anteriormente para vacas tratadas com eCG, sem realizar o desmame temporário [1,6,12].

O bom índice de prenhez alcançado no grupo Controle deveu-se provavelmente à oferta, à qualidade de pasto e ao bom índice pluviométrico na região durante o período de realização do experimento. Este fato também confirma observações anteriores de que vacas em boa condição corporal e ganhando peso não necessitam suplementação com hormônios folículo estimulantes para atingirem taxas de prenhez em torno de 50% [10,16,17].

### CONCLUSÃO

O uso de eCG ao final do protocolo de sincronização de estro e ovulação promoveu maior crescimento

folicular entre a retirada do implante de progesterona e a IATF, mas não se refletiu em um aumento significativo da taxa de prenhez, comparando-se aos índices de fêmeas tratadas dos grupos FSH e Controle.

O tratamento com FSH resultou em menor desenvolvimento folicular e concepção à IATF, não sendo recomendado seu uso como alternativa para melhorar a fertilidade de vacas de corte submetidas à sincronização de estros no pós-parto.

### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Zoetis. Guarulhos, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Hertape Calier Saúde Animal. Juatuba, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Chison. Jiang Su Province, China.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### REFERENCES

- 1 Barreiros T.R., Blaschi W., Santos G.M., Morotti F., Andrade E.R., Baruselli P.S. & Seneda M.M. 2014. Dynamics of follicular growth and progesterone concentration in cyclic and anestrous suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. *Theriogenology*. 81(5): 651-656.
- 2 Beltman M.E., Lonergan P., Diskin M.G., Roche J.F. & Crowe M.A. 2009. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*. 71(7): 1173-1179.
- 3 Bó G.A., Baruselli P.S. & Martinez M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*. 78(3-4): 307-326.
- 4 Borges J.B.S. & Gregory R.M. 2003. Indução da atividade cíclica ovariana pós-parto em vacas de corte submetidas à interrupção do aleitamento associada ou não ao tratamento com norgestomet-estradiol. *Ciência Rural*. 33(6): 1105-1110.
- 5 Dimmick M.A., Gimenez T. & Spitzer J.C. 1991. Ovarian endocrine activity and development of ovarian follicles during the postpartum interval in beef cows. *Animal Reproduction Science*. 24(3-4): 173-183.
- 6 Ereno R.L., Barreiros T.R.R., Seneda M.M., Baruselli P.S., Pegorer M.F. & Barros C.M. 2007. Pregnancy rates in milking Nelore cows submitted to progesterone treatment associated to temporary calf removal or eCG administration. *Brazilian Journal of Animal Science*. 36(5): 1288-1294.
- 7 Gimenes L.U., Sá Filho M.F., Carvalho N.A., Torres-Junior J.R., Souza A.H. & Madureira E.H. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 69(7): 852-858.
- 8 Lamb G.C., Stevenson J.S., Kesler D.J., Garverick H.A., Brown D.R. & Salfen B.E. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *Journal of Animal Science*. 79(9): 2253-2259.
- 9 Lopes A.S., Buttler S.T., Gilbert R.O. & Butler W.R. 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentration and success to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 99(1-2): 34-43.
- 10 Perry R.C., Corah L.R., Cochram R.C., Beal W.E., Stevenson J.S., Minton J.E., Simms D.D. & Brethour J.R. 1991. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*. 69(9): 3762-3772.
- 11 Perry G.A., Smith M.F., Roberts A.J., Macneil M.D. & Geary T.W. 2007. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 85(3): 684-689.
- 12 Pinheiro V.G., Souza A.F., Pegorer M.F., Satrapa R.A., Ereno R.L., Trinca L.A. & Barros C.M. 2009. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nelore cows. *Theriogenology*. 71(3): 519-524.

- 13 Roche J.F., Crowe M.A. & Boland M.P. 1992. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. *Animal Reproduction Science*. 28(1): 371-378.
- 14 Sá Filho O.J., Meneghetti M., Peres R., Lamb G. & Vasconcellos J.L.M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows. Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 72(2): 210-218.
- 15 Sá Filho M.F., Crespilho A.M., Santos J.E.P., Perry G.A. & Baruselli P.S. 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*. 120(1-4): 23-30.
- 16 Sales J.N.S., Crepaldi G.A., Giroto R.W., Souza A.H. & Baruselli P.S. 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrous Nelore cows. *Animal Reproduction Science*. 124(1): 12-18.
- 17 Santos I.C.C., Martins C.M., Valentin R. & Baruselli P.S. 2007. Taxa de prenhez a IATF de vacas zebuínas em anestro tratadas com dose única de FSH-p (Folltropin®). *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl 3): 1151.
- 18 Sartori R., Fricke P.M., Ferreira J.C.P., Ghinter O.J. & Wiltbank M.C. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*. 65(5): 1403-1409.
- 19 Vasconcellos J.L., Sartori R., Oliveira H.N., Guenther J.G. & Wiltbank M.C. 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 56(2): 307-331