

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CAMILA CUPPER VIEIRA

**TAXA DE GESTAÇÃO DE NOVILHAS RESSINCRONIZADAS AOS 14 DIAS PÓS-
IATF COM PROGESTERONA OU BENZOATO DE ESTRADIOL**

URUGUAIANA

2020

CAMILA CUPPER VIEIRA

**TAXA DE GESTAÇÃO DE NOVILHAS RESSINCRONIZADAS AOS 14 DIAS PÓS-
IATF COM PROGESTERONA OU BENZOATO DE ESTRADIOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Pugliesi

Uruguiana

2020

CAMILA CUPPER VIEIRA

**TAXA DE GESTAÇÃO DE NOVILHAS RESSINCRONIZADAS AOS 14 DIAS PÓS-
IATF COM PROGESTERONA OU BENZOATO DE ESTRADIOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal

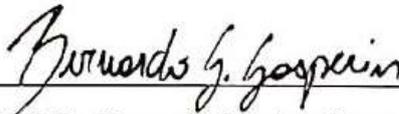
Dissertação defendida e aprovada em: 17/02/2020

Banca examinadora:



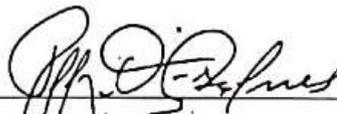
Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita

Orientador - UNIPAMPA



Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Universidade Federal de Pelotas - UFPEL



Prof. Dr. Paulo Dias Bayard Gonçalves

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia Vieira e Rafael Peixoto, e meus irmãos, Amanda e Felipe Vieira, obrigada pela compreensão, apoio e carinho que dedicam a mim, e por serem os maiores incentivadores dos meus sonhos.

Aos demais familiares, principalmente aos avós Marta Helena e Jesus Carlos e ao tio Ricardo, que estiveram sempre presentes incentivando e confortando meus passos.

À Universidade Federal do Pampa, pela formação acadêmica e profissional adquirida no decorrer dos cursos de graduação e pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita, que foi decisivo para a escolha deste caminho, por me acolher e compartilhar suas experiências. Obrigada pelo ensinamento, orientação e comprometimento com a formação profissional dos pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, sinceros agradecimentos pela coorientação, pelos ensinamentos e pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas e à equipe do Laboratório de Biotecnologia pelo auxílio na execução do experimento e aprendizados que proporcionaram.

À equipe do Laboratório de Fisiologia Molecular e Integrativa Molecular, pelos momentos compartilhados.

À Ourofino Saúde Animal pelo patrocínio e fornecimento dos materiais necessários para a execução deste projeto.

Aos proprietários das fazendas que nos acolheram no período do experimento e disponibilizaram os animais para a execução deste projeto.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal pela oportunidade de incrementar a minha formação.

As agências de financiamento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - código 001), CNPq, Finep, FAPERS e FAPESP pelo apoio para a execução deste projeto.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar as taxas de gestação de novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* ressincronizadas 14 dias após a primeira IATF com progesterona injetável de longa ação (P₄Inj) associada ao dispositivo intravaginal de P₄ às aquelas ressincronizadas pela associação de benzoato de estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de P₄. Foram utilizadas 677 novilhas (Braford e Brangus) submetidas a um ciclo de IATF (D0). No D14, os animais receberam um dispositivo intravaginal de P₄ (1 g, Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) e foram divididos aleatoriamente em dois grupos para receber: BE (1 mg I.M., Sincrodiol, Ourofino; n=339); ou P₄Inj (75 mg I.M., Sincrogest Injetável, Ourofino; n=338). No D22, os dispositivos foram retirados e o DG realizado pela detecção da luteólise morfológica através de avaliações ultrassonográficas em modo Doppler. Nas novilhas consideradas não gestantes (NG) foi mensurado o diâmetro do maior folículo (FD), e aplicado 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP, Ourofino), 250 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino) e 200 UI de eCG (SincroeCG, Ourofino), seguido da segunda IATF no D24. O modelo estatístico foi ajustado por análise de regressão logística (PROC GLIMMIX, SAS versão 9.2) considerando as seguintes variáveis: tratamento, raça, idade, fazenda e interações tratamento x fazenda, tratamento x raça, tratamento x idade. O diâmetro do FD no D22 nas novilhas NG não diferiu (P>0,05) entre os grupos BE (9,77 ± 0,25) e P₄Inj (9,92 ± 0,22). Não foi observada diferença entre os grupos BE e P₄Inj para taxa de gestação no D22 (56,3%, 191/339 versus 60,1%, 203/338, respectivamente), e no D40 pós-IATF (49,6%, 168/339 versus 53,3%, 180/338, respectivamente). A taxa de perdas gestacionais no DG22 em relação ao DG40 foi similar entre os grupos BE (12%, 23/191) e P₄Inj (11,3%, 23/203). A taxa de gestação na ressincronização do grupo P₄Inj (31,85%, 43/135) foi inferior à taxa do grupo BE (45,95%, 68/148). Em conclusão, propõe-se que a suplementação com 1 mg de BE ou 75 mg de P₄Inj em associação com o dispositivo de P₄ aos 14 dias pós-IATF é igualmente segura para a gestação em curso. Adicionalmente, enquanto a ressincronização da onda folicular pela associação de BE e dispositivo intravaginal de P₄ alcança taxas de gestação satisfatórias à segunda IATF, estudos complementares são necessários para investigar as aparentes baixas taxas de gestação obtidas pela associação de P₄Inj e dispositivo de P₄.

Palavras-chave: ressincronização precoce; progesterona injetável, benzoato de estradiol

ABSTRACT

The objective of this work was to compare the pregnancy rates of *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers resynchronized 14 days after the first TAI with long-acting injectable progesterone (iP₄) associated with the intravaginal P₄ device to those resynchronized by the association of estradiol benzoate (EB) and intravaginal P₄ device. Six hundred and seventy-seven heifers (Braford and Brangus) submitted to a TAI cycle (D0) were used. On D14, the animals received a P₄ intravaginal device (1 g, Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) and were randomly divided into two groups to receive: EB (1 mg I.M., Sincrodiol, Ourofino; n=339); or iP₄ (75 mg I.M., Injectable Sincrogest, Ourofino; n=338). On D22, the P₄ devices were removed and the pregnancy diagnosis (PD) performed by assessing morphological luteolysis through Doppler ultrasound examination. Heifers considered non-pregnant (NP) had the diameter of the dominant follicle (DF) measured and received 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP, Ourofino), 250 µg of sodium cloprostenol (Sincrocio, Ourofino) and 200 IU eCG (SincroeCG, Ourofino), followed by the second TAI on D24. The statistical model was adjusted for each dependent variable by logistic regression analysis (PROC GLIMMIX, SAS version 9.2) considering the following independent variables: treatment, race, age, ranch, and interactions treatment x ranch, treatment x race, treatment x age. The diameter of the DF on D22 in the NP heifers did not differ (P>0.05) between the EB (9.77 ± 0.25) and iP₄ (9.92 ± 0.22) groups. No difference was observed between the EB and iP₄ groups for pregnancy rate on D22 (56.3%, 191/339 versus 60.1%, 203/338, respectively), and D40 post-TAI (49.6%, 168/339 versus 53.3%, 180/338, respectively). The rate of pregnancy losses from PD22 to PD40 was similar between the EB (12%, 23/191) and iP₄ (11.3%, 23/203) groups. The resynchronization pregnancy rate of the iP₄ group (31.85%, 43/135) was lower than that of the EB group (45.95%, 68/148). In conclusion, it is proposed that supplementation with 1 mg EB or 75 mg of iP₄ in combination with the P₄ device at 14 days after TAI is equally safe for the ongoing pregnancy. Additionally, whereas the resynchronization of the follicular wave by the association of EB and intravaginal P₄ device reaches satisfactory pregnancy rates to the second TAI, complementary studies are necessary to investigate the apparent low pregnancy rates obtained by the association of iP₄ and P₄ device.

Keywords: early resynchronization; injectable progesterone; estradiol benzoate

LISTA DE FIGURAS

CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Modelo de programas de ressincronização, considerando os protocolos de IATF e ressincronização de 10 dias.21

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. Experimental Design. Six hundred and seventy-seven heifers submitted to TAI were randomly divided into two treatment groups on D14 post AI: EB group (device P₄ plus 1 mg of estradiol benzoate, n = 339), and iP₄ group (device P₄ plus the application of 75 mg of long-acting injectable progesterone, n = 338). The pregnancy diagnosis was performed on the D22 along with the removal of the P₄ device, pregnant heifers were removed from the study and pregnancy status verified on D40. Whereas non-pregnant heifers received doses of 1 mg of estradiol cypionate (EC), 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 250 µg of prostaglandin F2 alpha analogue (PGF2α), were inseminated a second time on D24, and their pregnancy was verified on D54. TAI - fixed-time artificial insemination; Doppler - doppler ultrasound examination; US - ultrasound examination on B-mode42

Figure 2. Pregnancy data of the first timed AI (TAI) and impact of the resynchronization protocols. A) Pregnancy rates on D22 and D40; B) Pregnancy loss between the first and second pregnancy diagnosis. Data from the first TAI of heifers submitted to a resynchronization protocol 14 days after first TAI and treated with 1 mg estradiol benzoate (EB, white bar) or with 75 mg long-acting injectable progesterone (iP₄, black bar) at the time of P₄ device insertion.43

Figure 3. Second timed AI (TAI) and overall pregnancy rates. A) Pregnancy rates on D54; B) Cumulative pregnancy rate. Data from the second TAI of heifers submitted to a resynchronization protocol 14 days after first TAI and treated with 1 mg estradiol benzoate (EB, white bar) or with 75 mg long-acting injectable progesterone (iP₄, black bar) at the time of P₄ device insertion. *P<0.05.....44

LISTA DE TABELAS

Table 1. P values of independent variables used in the statistical model for each dependent variable.	42
Table 2. Descriptive analyses according to ranch location.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Ciclo Estral	14
2.1.1 Ésteres de estradiol na manipulação do ciclo estral	16
2.1.2 Progesterona na manipulação do ciclo estral	18
2.2 Programas de ressincronização	20
2.2.1 Ésteres de estradiol na ressincronização	21
2.2.2 Progesterona na ressincronização.....	23
2.3 Doppler	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	29
Fertility in response to resynchronization using long-acting injectable progesterone or estradiol benzoate at 14 days post-TAI in <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> beef heifers.....	30
1. Introduction	31
2. Material and methods	32
3. Results	34
4. Discussion	35
5 CONCLUSÕES.....	45
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Nos próximos 10 anos, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2017), a população mundial aumentará em mais de 1 bilhão de pessoas, alcançando 8,6 bilhões de habitantes em 2030, sendo que o maior crescimento deverá ser observado nos países desenvolvidos. Neste sentido, para atender a demanda por alimentos a produção de proteína animal deverá aumentar em 15% até 2027 (OECD/FAO, 2018). Considerando apenas a produção mundial de carne bovina em 2019, que foi de 61.306 toneladas (USDA, 2019), isto representaria uma necessidade de crescimento de aproximadamente 9.000 toneladas por ano. No cenário da pecuária de corte mundial o Brasil encontra-se em posição de destaque, sendo o segundo maior produtor de carne bovina, com cerca de 10.000 toneladas/ano (USDA, 2019), além de possuir o maior rebanho comercial de bovinos, com aproximadamente 232 milhões de cabeças (USDA, 2018). A característica de produção brasileira associada a um perfil de pecuária extensiva coloca o Brasil em situação privilegiada em um cenário de aumento da produtividade animal com baixo impacto ambiental (LUCHIARI FILHO, 2006) a fim de suprir a crescente demanda por proteína animal. Atender à demanda por alimentos de maneira econômica e ecologicamente sustentável significa aumentar os índices reprodutivos do rebanho, e nesse contexto, mais uma vez, a pecuária brasileira encontra-se em posição privilegiada uma vez que seu potencial produtivo pode ser considerado subutilizado. Os atuais índices reprodutivos médios brasileiros resultam, em uma parcela das propriedades, de práticas de manejo inapropriadas, como excesso de carga animal e ausência de separação das categorias animais visando manejos específicos (MENEGAZ; LOBATO; PEREIRA, 2008). Nesse contexto, o cenário almejado no tocante à eficiência reprodutiva pode ser definido, de maneira simplista, pela produção de um terneiro ao ano por matriz. Porém esta meta esbarra em alguns entraves como, por exemplo, o prolongamento do anestro pós-parto e deficiências nutricionais, especialmente nas fêmeas primíparas, as quais necessitam de manejo estratégico afim de lhes proporcionar o aporte nutricional suficiente para concluir seu crescimento corporal, suprir demandas associadas à lactação, e tornar-se gestante novamente (MENEGHETTI, 2006).

A partir da evolução do conhecimento acerca da fisiologia e endocrinologia do ciclo estral tornou-se possível controlar o desenvolvimento da onda folicular, regredir o corpo lúteo

de vacas cíclicas, sincronizar e induzir a ovulação (BARUSELLI et al., 2017), e consequentemente, estimular a disseminação da inseminação artificial. Como consequência dos avanços do controle farmacológico da fisiologia reprodutiva a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem sido difundida de forma crescente no Brasil afim de otimizar as práticas de manejo e desvincular a necessidade de detecção de cio da utilização da inseminação artificial. Adicionalmente, a IATF proporciona alto percentual de fêmeas gestantes no início da estação de monta, padronização do rebanho e a concentração da mão de obra (BARUSELLI et al., 2017). Todavia, tal estratégia pode ser considerada subutilizada no cenário brasileiro, uma vez que, dados coletados em 2017 mostram que apenas 11,7% do rebanho bovino nacional foi inseminado (ASBIA, 2017).

Devido a falhas individuais na resposta à manipulação farmacológica ou a perdas embrionárias, fêmeas que não se tornaram ou mantiveram gestantes necessitam ser inseminadas novamente o mais brevemente possível, para que ainda sejam capazes de gerar um produto por ano. Nesse contexto, as investigações científicas no campo do controle farmacológico do ciclo estral e da detecção precoce de gestação têm potencial de estabelecer novas estratégias com impacto significativo na eficiência dos programas reprodutivos. Estratégias de ressincronização têm sido desenvolvidas para serem implementadas após o diagnóstico de gestação (DG) pós-IATF, usualmente realizado por ultrassonografia transretal, entre os dias 28 e 40 pós-inseminação (BARUSELLI et al., 2012). Por essa estratégia, fêmeas que nunca estiveram gestantes ou que interromperam precocemente a gestação somente serão identificadas após transcorrido um ou até dois ciclos estrais. Estrategicamente, uma abordagem para ser considerada precoce deveria identificar fêmeas não gestantes antes do retorno ao estro. Ressalta-se ainda que, tal estratégia deve permitir a manipulação farmacológica, visando a ressincronização de forma segura e eficiente e a redução do impacto negativo de fêmeas que não responderam ao protocolo ou que perderam a gestação. Um dos primeiros passos nessa direção foi dado por Lucy; McDougall; Nation (2004), que propuseram que a ressincronização poderia ser realizada entre os dias 17 e 19 após a IATF, uma vez que os métodos de DG fossem aperfeiçoados. Os autores sincronizaram vacas de leite no pós-parto utilizando o protocolo Ovsynch, as quais foram divididas em dois grupos: inseminadas e não inseminadas no dia 0. Ambos os grupos foram ressincronizados com o mesmo protocolo iniciando 11 dias após a inseminação. Enquanto as fêmeas inseminadas foram consideradas todas gestantes, as não inseminadas receberam prostaglandina, seguido de GnRH dois dias depois, sendo inseminadas no dia 21. Esse trabalho demonstrou que é

possível oportunizar uma segunda chance de concepção às vacas não gestantes dentro do intervalo de um único ciclo estral. Entretanto, a evolução desta estratégia depende do desenvolvimento de métodos que possibilitem detectar as fêmeas não gestantes o mais precocemente possível, e assim aumentar o número de oportunidades de cada fêmea se tornar gestante dentro de uma mesma estação reprodutiva.

Estratégias de ressincronização precisam contemplar os seguintes aspectos: capacidade de sincronização da onda folicular, segurança para o conceito potencialmente presente, e ausência de interferência no processo ovulatório subsequente. Alguns autores que testaram ésteres de estrógeno em diferentes momentos após a inseminação artificial demonstraram diferentes resultados. Com relação a dinâmica folicular os ésteres associados ao implante intravaginal de progesterona (P_4) apresentam resultados semelhantes. A utilização de 5 mg de estradiol 17β (E17 β) em vacas, 1 mg de cipionato de estradiol (CE) e 1 mg de benzoato de estradiol (BE) em novilhas sincronizam a emergência da onda folicular para $3,7 \pm 0,6$ dias após o tratamento (MARTÍNEZ et al., 2005; ANDRADE; et al., 2012). Entretanto, a respeito das taxas de gestação na ressincronização iniciada aos 13 dias, enquanto a utilização de 0,5 ou 1,5 mg de E17 β reduz as taxas de gestação em novilhas (COLAZO et al., 2006) e 0,5 mg de CE em vacas é insuficiente para melhorar as taxas de gestação (STEVENSON et al., 2003), a utilização de 1 mg de BE em vacas aumenta as taxas de concepção (MACMILLAN et al., 2001). Ao passo que a dose de 1 mg de BE tem sido considerada adequada para sincronizar a onda folicular e as taxas de gestação em novilhas e vacas, o seu potencial luteolítico de acordo com diferentes categorias animais carece de maior investigação.

Tendo em vista a existência de barreiras legais quanto ao uso de ésteres de estrógeno, uma alternativa para os protocolos de ressincronização é a utilização de progesterona. Algumas concentrações e formulações de progesterona já foram testadas em vacas no pós-parto. Colazo et al., (2007) relataram que a utilização de 150 mg progesterona dissolvida em óleo de canola em associação com um dispositivo intravaginal de P_4 no diestro de vacas não gestantes não foi capaz de sincronizar o surgimento de uma nova onda folicular. Por outro lado, a utilização de 75 mg de P_4 injetável de longa ação associado ao implante intravaginal de P_4 na ressincronização iniciada aos 12 dias em vacas primíparas e múltíparas aumenta as taxas de gestação da segunda IA com relação ao grupo tratado apenas com o implante de P_4 , (PUGLIESI et al., 2019a). Apesar de relatos indicando sucesso na utilização de P_4 na ausência de E2 para sincronizar a onda folicular, a literatura sugere que existem diferenças de resultados de acordo com a formulação e doses da fonte de progesterona injetável. Nesse

contexto, faz-se necessário mais estudos acerca da formulação e dose adequada da fonte de P₄ injetável, bem como da sua adequação de acordo com a categoria animal.

O uso de estradiol em programas de sincronização e ressincronização é bem difundido, porém em alguns países sua utilização é proibida, especialmente com relação à sua ação como melhorador de desempenho produtivo, o que acaba impedindo seu uso em programas de manipulação do ciclo estral em bovinos. Adicionalmente, resultados inconsistentes mantêm o receio acerca do impacto negativo do uso do estrógeno em vacas gestantes. Portanto, faz-se necessário buscar alternativas à sua utilização em programas reprodutivos. A progesterona injetável pode ser uma alternativa ao uso do estradiol em tais programas. Apesar dos recentes avanços acerca da utilização da P₄ como agente de sincronização da emergência da onda folicular, algumas questões necessitam ser mais bem definidas, como por exemplo, sua utilização em novilhas, uma vez que estas apresentam peso e metabolismo diferentes de vacas no pós-parto. Por isso, faz-se necessário mais estudos acerca da dose ideal de progesterona capaz de sincronizar o surgimento da onda folicular e aumentar as taxas de gestação na ressincronização, sem que haja interferência negativa na gestação em estabelecimento ou no processo ovulatório subsequente (PANCARI et al., 2002; CAVALIERI, 2018). Como não se tem estudos utilizando a P₄ injetável de longa ação em protocolos de ressincronização super precoce em novilhas, optamos por iniciar o protocolo aos 14 dias para diminuir as chances da P₄ interferir na gestação em estabelecimento. Visto isso, o objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência da P₄ injetável (P₄Inj) associada ao dispositivo intravaginal de P₄ àquela do benzoato de estradiol (BE) no início da ressincronização realizada aos 14 dias em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral

O ciclo estral das fêmeas bovinas ocorre durante todo o ano, sendo elas consideradas poliéstricas anuais com a atividade cíclica somente interrompida quando a fêmea apresenta-se em gestação, lactação ou em função de condições patológicas (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED;, 2012). As fêmeas bovinas apresentam o intervalo entre dois períodos de receptividade sexual (cio ou estro) de aproximadamente 21 dias, e o ciclo estral pode ser dividido em fase folicular, que dura de 3 a 6 dias, e fase luteínica, com duração de 16 a 17 dias (BALL; PETERS, 2006).

A luteólise marca o início da fase folicular a qual envolve a finalização do desenvolvimento folicular e o conseqüente aumento das concentrações de estradiol (E_2). A retroalimentação negativa que a progesterona (P_4) exerce na produção de GnRH junto ao hipotálamo é removida a partir da luteólise. Com isso, o hipotálamo aumenta a frequência de liberação dos pulsos de GnRH para um pulso a cada 1,5 a 2 horas, o que estimula a liberação de pulsos do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH; QUIRK; FORTUNE, 1986). As gonadotrofinas estimulam o crescimento folicular e com isso a produção de E_2 pelos folículos. Na fase folicular, após a luteólise, ocorre a transição da dominância entre os hormônios esteroides (diminuição de P_4 e aumento de E_2), o aumento de E_2 leva a um pico de LH que resultará na ovulação (QUIRK; FORTUNE, 1986). O desenvolvimento folicular em bovinos ocorre na forma de ondas (LUCY et al., 1992). Estudos realizados em fêmeas *Bos taurus* (raça Holandesa) demonstraram o predomínio de duas a três ondas de crescimento folicular (WOLFENSON et al., 2004); já em *Bos indicus* (raça Nelore) os relatos indicam a maior incidência de três ondas foliculares, sendo relatadas até quatro ondas (FIGUEIREDO et al., 1997). Em resumo, na fase folicular ocorrem os seguintes eventos: a luteólise que marca o início da fase, alternância de dominância entre os hormônios P_4 e E_2 , preparação do folículo para a ovulação, e a ovulação propriamente dita, que marca o final desta fase.

A fase luteínica inicia com a ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo (CL), terminando com a luteólise. O CL é formado logo após a ovulação, quando o espaço que antes

era ocupado por células foliculares da teca e granulosa passa a ser preenchido por células foliculares luteinizadas (células luteais pequenas e grandes) e células não esteroidogênicas como fibroblastos, células do sistema imune e células endoteliais (WEBB; WOAD; ARMSTRONG, 2002). O estabelecimento de uma rede vascular robusta representa aspecto de extrema relevância para o desenvolvimento e manutenção do CL e é indispensável para o desempenho de suas funções (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2000). A vascularização do CL é desenvolvida pelo processo de angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais oriundas de vasos preexistentes (KAWATE et al., 2003). Uma vez formado, o CL passa a produzir P₄, hormônio predominante nesta fase, que no hipotálamo exerce retroalimentação negativa sobre a frequência dos pulsos de GnRH que passam a ocorrer em intervalo de 4 a 8 horas (NETT et al., 2002). A P₄ ainda prepara o útero para receber o embrião com a estimulação de secreção das glândulas endometriais e o efeito inibitório sobre as contrações do miométrio (BALL; PETERS, 2006). A área do corpo lúteo, que em fêmeas *Bos indicus* varia de 17 a 21 mm² (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997), e em fêmeas *Bos taurus* de 20 a 30 mm² (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; KASTELIC; BERGFELT; GINTHER, 1990), está diretamente relacionada à sua capacidade de produção de P₄ (D'OCCHIO et al., 1999). Da mesma forma, o nível de vascularização e perfusão sanguínea estão intimamente relacionados à funcionalidade do CL (MIYAMOTO et al., 2005). Na fase luteínica o LH causa a diferenciação celular que resulta na alternância de dominância entre os hormônios esteroides, diminuindo as concentrações de E₂ (<2 pg/ml) e aumentando as de P₄, até atingir a função plena do CL (platô de P₄), para depois ser finalizada com a luteólise, para uma duração de 10 a 14 dias. No final da fase luteínica cíclica o CL pode manter sua funcionalidade, nos casos em que a presença de um concepto viável bloqueia o mecanismo luteolítico, ou regredir em resposta à luteólise na ausência do reconhecimento materno da gestação.

Em ruminantes, a luteólise é causada pela liberação de ocitocina pelo CL que atua no endométrio, que na ausência de embrião produz PGF₂α. Com a luteólise, há diminuição das concentrações de P₄ removendo o bloqueio da liberação de GnRH, conforme mencionado no início desta seção. Em fêmeas gestantes é necessário que o embrião sinalize sua presença para evitar a luteólise visando à manutenção da gestação. Esse processo é conhecido como reconhecimento materno de gestação. Em bovinos as células trofoblásticas do blastocisto sintetizam o IFN-tau que atua no reconhecimento de gestação, o qual ocorre entre o 16º ao 19º

dia de gestação (FORDE; LONERGAN, 2017). O IFN-tau atua no endométrio inibindo a síntese dos receptores de ocitocina, hormônio responsável por estimular a produção de PGF2 α pelo endométrio. Nesse contexto, sem a PGF2 α não há luteólise (SPENCER et al., 2004). O IFN-tau juntamente com a P₄, atua aumentando a produção de histotrofo pelas glândulas uterinas (O'HARA et al., 2014). Dada a importância da atividade do CL, manipulações farmacológicas que possam comprometer sua funcionalidade ou induzir a luteólise podem também impactar negativamente a fertilidade.

2.1.1 Ésteres de estradiol na manipulação do ciclo estral

O estradiol atua de maneira distinta na presença ou ausência de progesterona. Na ausência de progesterona o estradiol induz a ovulação e na presença induz o crescimento folicular. O estradiol atua realizando a retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH, uma vez que o aumento da frequência de pulsos de GnRH induzidos por estradiol favorece a liberação de LH em detrimento do FSH (DÖCKE; DÖRNER, 1965; MOENTER et al., 1991). As concentrações séricas de FSH que flutuam entre 50 e 80 ng/ml, são reduzidas a < 25 ng/ml 24 horas após o pico de estradiol (NETT et al., 2002; FERRAZ et al., 2008). O estradiol age aumentando a sensibilidade da glândula hipófise ao GnRH, e após a sensibilização causa um aumento drástico na liberação GnRH, e as concentrações desse hormônio na hipófise passam de < 5 pg/min a 35 pg/min 12 horas após o pico de estradiol (NETT et al., 2002). Conseqüentemente, na ausência de P₄ o GnRH estimula a liberação maciça de LH e induz a ovulação, na presença de um folículo dominante, através do pico pré-ovulatório que alcança 100 a 150 ng/ml (NETT et al., 2002). Price; Webb, (1988) utilizaram estradiol em um protocolo de sincronização da ovulação, e observaram que o efeito do estradiol exógeno é semelhante ao endógeno, causando a diminuição das concentrações séricas de FSH e aumentando a amplitude do pulso de LH.

A escolha do éster de estradiol a ser utilizado varia de acordo com a necessidade do protocolo. Uma vez que os ésteres possuem características farmacocinéticas distintas, como a meia vida, o éster utilizado irá determinar o momento da sua aplicação visando à indução de uma nova onda folicular ou a ovulação. O estradiol 17 β (E17 β) atinge um pico nas concentrações de estradiol em duas horas após sua aplicação, retornando às concentrações basais em 6 horas (LARSON; BALL, 1992); para o benzoato de estradiol (BE) o pico ocorre

em 4 horas, permanecendo elevado por 24 horas (DRIOWO et al., 1980; BURKE et al., 2000). Já o cipionato de estradiol (CE) possui meia vida maior, uma vez que o pico das concentrações de estradiol ocorrem 36 horas após sua aplicação e permanece elevado por mais 96 horas (DRIOWO et al., 1980; SALES et al., 2012). Quando considerado o momento da emergência da onda folicular, a utilização de 1 mg de BE associado ao dispositivo intravaginal de P₄ em vacas (raça Hereford) sincroniza o surgimento de uma nova onda folicular para $3,6 \pm 0,5$ dias após o tratamento (PRICE; WEBB, 1988). Esse resultado é semelhante quando em novilhas é utilizado o dispositivo de P₄ associado a 100 mg de P₄ injetável e 1 mg de BE, que induz o surgimento da onda folicular $3,7 \pm 0,6$ dias após o tratamento (MARTÍNEZ et al., 2005). Com relação a utilização de ésteres de estradiol na indução da ovulação os mais utilizados atualmente são o BE e o CE, sendo que possuem momento da indução da ovulação diferentes. Quando utilizados junto a remoção do dispositivo intravaginal de P₄ o BE induz a ovulação para $60,6 \pm 1,7$ horas e o CE para $72,9 \pm 1,6$ horas após a remoção da P₄ (CREPALDI et al., 2019). Com base no exposto, conclui-se que o estradiol pode ser utilizado em protocolos de sincronização da onda folicular ou ovulação (MARTINEZ et al., 2000; MAPLETOFT et al., 2003; FERRAZ et al., 2008).

O estradiol é capaz de sincronizar a emergência da onda folicular, porém um aspecto potencialmente negativo da sua utilização diz respeito a sua capacidade de induzir o mecanismo luteolítico. A luteólise tem início por volta de 15 dias após a ovulação em vacas, período que coincide com o aumento da expressão dos receptores de ocitocina endometriais, que se dá entre 15 a 17 dias pós-ovulação (ROBINSON et al., 2001; ARAUJO et al., 2009). A ligação da ocitocina com seus receptores desencadeia a secreção pulsátil de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) e resultará em luteólise (FLINT; SHELDRIK, 1983). Experimento realizado utilizando 5 mg de BE associado ao implante de liberação intravaginal de P₄ em novilhas (raça Hereford), observou que o BE diminui as concentrações séricas de P₄, sugerindo que o estradiol está envolvido na cascata de liberação de prostaglandina a fim de induzir a luteólise (MUNRO; MOORE, 1985). Thatcher et al., (1986) realizaram experimento em novilhas com o objetivo de determinar se o estradiol tem efeito luteolítico, através da mensuração do metabólito da PGF₂ α (PGFM) na circulação periférica. Para isso, foi sincronizada a emergência da onda folicular de novilhas com um implante auricular de progesterona por 9 dias, 13 dias após o início da sincronização os animais receberam 3 mg de estradiol 17 β ou 6 ml de placebo. Os autores observaram que o estradiol aumenta as concentrações séricas de PGFM entre 5 e 6 horas após o tratamento, antecipando a luteólise em 2,5 dias em relação ao

grupo controle (THATCHER et al., 1986). O mesmo foi observado por Araujo et al., (2009), que realizaram experimento em novilhas da raça Holandesa, as quais tiveram os folículos maiores de 4 mm aspirados entre os dias 9 e 15 pós ovulação, e receberam 1 mg de BE ou placebo no dia 13. Os autores observaram que o estradiol causa aumento nas concentrações de PGFM 2 horas após o tratamento e induz um pico as 12 horas (700 pg/ml), confirmando a sua importância como regulador da liberação de PGF 2α pelo útero (ARAUJO et al., 2009). A fim de comparar o padrão de expressão do receptor de ocitocina, receptor alfa de estradiol e receptor de progesterona, foi acompanhado o ciclo estral de quatro vacas não lactantes e coletadas amostras de sangue diariamente e biopsias uterinas dos dias 2 ao 14 a cada 48 horas e diariamente dos dias 15 ao 21 (D0 – ovulação). Os autores observaram que o estradiol estimula a expressão dos receptores e a progesterona inibe a expressão, sendo que o aumento na expressão dos receptores de ocitocina ocorre concomitantemente ao aumento dos receptores alfa de estradiol (ROBINSON et al., 2001). O potencial luteolítico do estradiol enseja estudos acerca da identificação de doses e/ou momentos de aplicação que não desencadeiem o mecanismo luteolítico em animais potencialmente gestantes.

2.1.2 Progesterona na manipulação do ciclo estral

O mecanismo pelo qual a progesterona, produzida pelo corpo lúteo, induz a emergência de nova onda folicular parece estar relacionado com a supressão da liberação pulsátil de LH em bovinos (BERGFELD et al., 1996). A frequência elevada de liberação o LH pode prolongar a vida útil do folículo. Por outro lado, a frequência reduzida, encurta a vida útil do folículo dominante pela indução da sua atresia, levando ao surgimento de nova onda folicular (STOCK; FORTUNE, 1993). Conforme os folículos se desenvolvem aumentam o número de receptores de LH, tornando-se menos dependentes do FSH e mais responsivos ao LH (SIROIS; FORTUNE, 1990). Portanto, reduções na secreção de LH podem induzir atresia de folículos dominantes, uma vez que a demanda por LH não é atendida (CAVALIERI, 2018). Associado à atresia do folículo dominante há uma diminuição na síntese de inibina, o que permite um aumento nas concentrações de FSH, induzindo a emergência de uma nova onda folicular (CAVALIERI et al., 2003).

Outro mecanismo que parece estar associado à ação da progesterona em modificar o padrão de desenvolvimento folicular é a inibição da indução da aromatase pelo FSH nas

células da granulosa. Uma vez que o estradiol estimula a proliferação destas células e expressão dos receptores de LH, a redução nas concentrações de estradiol a partir de uma redução da atividade de aromatase pode levar o folículo à atresia (FORTUNE; VINCENT, 1983). Experimento realizado *in vitro*, demonstrou que a P₄ inibe diretamente o complexo enzimático da aromatase e a habilidade da célula em converter andrógeno em estradiol (HUNTER; SOUTHEE, 1987). Baixas concentrações de P₄ (<1-2 ng/ml) após a luteólise, geram um aumento da frequência dos pulsos de LH e maior síntese de estradiol pela granulosa, levando o folículo dominante à ovulação (SIROIS; FORTUNE, 1990).

Em vacas o sucesso da gestação depende do desenvolvimento adequado do embrião e produção da proteína antiluteolítica, interferon tau para prevenir a secreção de PGF₂ α pelo endométrio (YAN et al., 2016). O principal hormônio que controla o estabelecimento da gestação é a P₄, e concentrações insuficientes do mesmo resultam em desenvolvimento embrionário deficiente e falha em impedir a luteólise (YAN et al., 2016). Concentrações adequadas de progesterona estimulam a produção de histotrofo que facilita a implantação e o desenvolvimento inicial do embrião, e auxiliam na manutenção da gestação estimulando o crescimento uterino e opondo-se às ações de fatores envolvidos na contração do miométrio (DINNY GRAHAM; CLARKE, 1997). Por outro lado, o momento do início e o tempo de exposição à progesterona tem efeito na funcionalidade do CL e no desenvolvimento embrionário inicial (PARR et al., 2017). Garret et al., (1988) observaram que a suplementação com 100 mg de progesterona no início do ciclo estral (de 1 a 4 dias) antecipa a liberação do metabólico da PGF₂ α , causando luteólise. Os autores concluíram que a P₄ causa a luteólise de maneira indireta, através da alteração do ambiente uterino (GARRETT et al., 1988). O mesmo foi observado quando utilizado 150 mg ou 300 mg de progesterona de longa ação três dias após a ovulação ou implante intravaginal com 1,55 g P₄ entre 3 e 7 dias pós-ovulação em vacas multíparas, no qual a vida útil do corpo lúteo foi reduzida (BILBY et al., 2013; O'HARA et al., 2014; PUGLIESI et al., 2014a), antecipando a luteólise em aproximadamente três dias. As concentrações de P₄ entre os dias 3 e 8 alteram o ambiente uterino através da aceleração ou redução da transcrição endometrial e produção do histotrofo (O'HARA et al., 2014; BATISTA et al., 2019).

A progesterona é utilizada em protocolos de sincronização da emergência da onda folicular pois induz a atresia do folículo dominante e de folículos persistentes culminando em uma boa sincronia da onda folicular (ANDERSON; DAY, 1994; CAVALIERI et al., 1998), e reduz a variabilidade do diâmetro dos folículos (KINDER et al., 1996; CAVALIERI et al.,

1998). Além disso, concentrações altas de P₄ podem gerar embriões maiores (CARTER et al., 2008), além de aumentarem as taxas de concepção em novilhas (DISKIN; MORRIS, 2008). Neste contexto, os efeitos da suplementação com P₄ na melhoria das taxas de gestação foram avaliados por meio de meta análise (YAN et al., 2016) e de acordo com as seguintes categorias: programa de acasalamento (estro natural, sincronização do estro, sincronização da ovulação); momento da suplementação em relação ao aumento da P₄ pós-ovulatória (<D3, entre D3 e D7, >D7); taxas de concepção no grupo controle (<30%; 30-45%; 45,1-60%; >60%). Os resultados demonstraram que a suplementação com P₄, independente da forma e via de administração, aumenta as chances de gestação nos animais com baixa fertilidade, (<45% de gestação no controle), suplementados entre os dias 3 e 7 do ciclo estral em programas de estro natural (YAN et al., 2016).

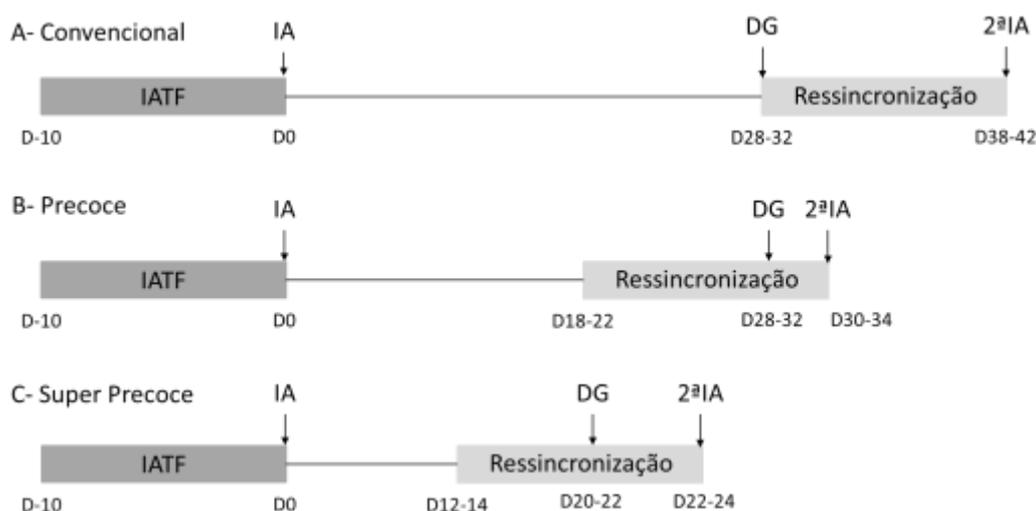
2.2 Programas de ressincronização

A ressincronização é a abordagem farmacológica utilizada para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular e/ou ovulação de fêmeas que foram previamente submetidas à sincronização e inseminação artificial (BARUSELLI et al., 2017). Na busca contínua pela intensificação dos programas reprodutivos, os protocolos de ressincronização da ovulação objetivam aumentar a eficiência do programa reprodutivo por meio da redução no intervalo entre inseminações. Considerando que o ciclo estral de vacas inseminadas por IATF que não se tornaram gestantes é sincronizado, a ressincronização para uma segunda IA é viável e representa uma etapa subsequente lógica.

A ressincronização é comumente iniciada após o diagnóstico de gestação. Considerando que o método de diagnóstico de gestação mais utilizado é a ultrassonografia transretal aos 30 dias pós-IATF, o intervalo entre duas inseminações seria de aproximadamente 40 dias (Figura 1A). Alternativas para diminuir o intervalo entre inseminações vêm sendo estudadas. Sabe-se, por exemplo, que a utilização de prostaglandina é incompatível com a manutenção da gestação, portanto sua utilização não é indicada em programas de ressincronização, antes da identificação acurada do status gestacional. Neste contexto, o programa de ressincronização precoce propõe iniciar a manipulação farmacológica antes do DG, de maneira que a última etapa, a qual envolve um agente luteolítico, coincida com o dia do DG (Figura 1B). A utilização do modo Doppler como ferramenta para o DG precoce, permite antecipar o início

da ressincronização para 12 ou 14 dias pós-IATF, encurtando o intervalo entre inseminações para 24 dias (Figura 1C).

Figura 1. Modelo de programas de ressincronização, considerando os protocolos de IATF e ressincronização de 10 dias.



A realização de protocolos de sincronização para IATF, seguidos de protocolos de ressincronização e métodos de DG precoce permitem a redução do intervalo entre o parto e a nova concepção, aumentando consequentemente a produtividade animal. A utilização de estradiol como agente de sincronização da onda folicular é bem difundida e tem demonstrado potencial para melhorar as taxas de gestação da ressincronização. Alternativamente, a progesterona injetável, que atua por mecanismo distinto do estradiol para sincronizar a onda folicular, tem sido proposta como alternativa. Alguns programas de ressincronização têm empregado a progesterona injetável (CAVALIERI et al., 1998, 2003; PUGLIESI et al., 2019a), contudo, sua utilização em programas chamados “super precoce” é relativamente nova e carece de melhor caracterização acerca de aspectos como dose por categoria (ex.: novilhas).

2.2.1 Ésteres de estradiol na ressincronização

A utilização de estradiol em protocolos de ressincronização tem sido alvo de investigação. Em estudo realizado comparando as taxas de gestação entre novilhas, primíparas e múltiparas não gestantes que utilizou 1 mg de BE na ressincronização iniciada aos 30 dias após a primeira inseminação, observou-se que as novilhas responderam melhor ao tratamento atingindo taxas de concepção a 2ª inseminação (66%) maiores que aquelas de outras categorias animais (MARQUES et al., 2015). Com isso, concluiu-se que a ressincronização aos 30 dias com BE proporciona taxas concepção dentro do limite esperado em novilhas não gestantes.

Bartolome et al., (2005) avaliaram as taxas de gestação e perdas gestacionais de vacas de leite que iniciaram a ressincronização aos 23 dias após a primeira IATF com 100 µg de GnRH. No dia 30 foi realizado o DG e as vacas não gestantes foram divididas em dois grupos: 100 µg de GnRH no dia 32, ou 25 mg de cipionato de estradiol (CE) no dia 31, ambos os grupos foram inseminados no dia 33. Os autores relataram que as taxas de gestação e perdas gestacionais não diferiram significativamente entre os grupos (BARTOLOME et al., 2005). Sá Filho et al., (2014) descreveram que a ressincronização pode ser realizada com sucesso e sem prejuízos às fêmeas gestantes aos 22 dias após a primeira IA com a utilização de 1 mg de BE associado ao implante auricular de P₄. Sua conclusão foi baseada na comparação entre um grupo em que não foi realizado nenhum tratamento e as ressincronizações iniciadas aos 22 dias com BE ou 100 µg de GnRH, sendo que o grupo BE apresentou maior taxa de gestação (SÁ FILHO et al., 2014). Em face aos resultados positivos oriundos do BE na sincronização da emergência da onda folicular (ALMEIDA et al., 2015) e nas taxas de gestação (SÁ FILHO et al., 2014), é possível afirmar que o BE tem se consolidado como agente de ressincronização precoce.

A utilização de estradiol em protocolos de ressincronização iniciados nos dias 12 e 14 após a IA pode comprometer a habilidade do corpo lúteo em produzir progesterona e conseqüentemente a manutenção da gestação (MUNRO; MOORE, 1985; EL-ZARKOUNY; STEVENSON, 2004). Macmillan et al., (2001) indicam que a utilização de uma dose baixa (1 mg) de BE associado ao implante intravaginal de P₄ na ressincronização realizada entre 12 e 14 dias após a primeira inseminação, é capaz de sincronizar a manifestação do estro para 9-10 dias após sua aplicação, e ainda aumenta as taxas de concepção da segunda IA em vacas de leite. Estudos realizados utilizando a associação de 1 mg de BE com implante intravaginal de P₄ aos 13 dias após a inseminação em vacas relatam que o tratamento sincroniza o desenvolvimento do folículo ovulatório (BURKE et al., 2000), aumenta a manifestação do

estrogeno em fêmeas não gestantes (STEVENSON et al., 2003), e aumenta as taxas de gestação (EL-ZARKOUNY; STEVENSON, 2004), comparados às fêmeas que não receberam estradiol. Considerando a consolidação do BE como agente sincronizador de onda folicular em programas de ressincronização super precoce em vacas, propomos a verificação da sua capacidade sincronizadora e segurança em relação à gestação em curso em comparação a um agente alternativo, a progesterona injetável de longa ação, em novilhas.

2.2.2 Progesterona na ressincronização

A progesterona em protocolos de ressincronização tem sido alvo de investigação. A utilização de implante intravaginal com 1,38 g de P₄ associado a 100 µg de GnRH na ressincronização aos 34 dias resulta em aumento nas taxas de gestação em comparação com a utilização apenas do GnRH (BISINOTTO et al., 2010). Bilby et al., (2013) avaliaram a utilização de implante intravaginal com 1,38 g de progesterona em protocolos de ressincronização iniciados aos 32 e 39 dias após a primeira inseminação e concluíram que a P₄ reduz a incidência de ovulação precoce e aumenta a sincronização da manifestação do estro. Contudo, só aumentou as taxas de gestação nas fêmeas que não apresentaram corpo lúteo, com concentrações séricas de P₄ inferiores a 1 ng/ml no início da ressincronização. Devido à inconsistência dos dados acerca da ação da suplementação exclusiva por implante de P₄ sobre a fertilidade, Bisinotto et al., (2015) realizaram uma meta análise para avaliar os efeitos da suplementação com P₄ durante programas de IATF (sincronização e ressincronização aos 32 dias) em diferentes condições fisiológicas e de gerenciamento de propriedades. Os resultados demonstram que as chances de gestação aos 60 dias pós-inseminação é 10% maior com o implante intravaginal, significando no geral um aumento de 3,8% nas taxas de gestação de vacas de leite, de 31,5 para 35,3% (BISINOTTO et al., 2015). Apesar desta meta análise concluir que o implante de P₄ é suficiente para aumentar as taxas de gestação, alguns autores realizaram estudos testando outras vias de administração e concentrações de P₄ a fim de incrementar a eficiência de protocolos de ressincronização da emergência da onda folicular, conforme descrito a seguir.

Em protocolos de ressincronização super precoce foram testadas a associação do implante de P₄ com uma dose de P₄ injetável em vacas de corte *Bos taurus* e *Bos indicus* (raça Nelore), com status reprodutivo (gestante ou não gestante) desconhecido. Colazo et al., (2007)

descreveram o efeito do uso de 150 mg de progesterona injetável na ressincronização iniciada aos 13 dias após a primeira inseminação em vacas não lactantes (raça Angus). Os autores concluíram que a P₄ não sincroniza o surgimento de uma nova onda folicular e ainda reduz o número de folículos pequenos, sugerindo que não houve recrutamento folicular (COLAZO et al., 2007). Estudo mais recente realizado em vacas no pós-parto (raça Nelore, 53,7 ± 4,3 dias pós-parto), utilizando 75 mg de progesterona de longa ação na ressincronização iniciada aos 12 dias, concluiu que as taxas de gestação e de manifestação de estro foram superiores no grupo tratado com a associação do implante intravaginal de P₄ e a P₄ injetável em relação ao grupo só com o implante (PUGLIESI et al., 2019a). Penteadó et al., (2016) realizaram experimento em vacas lactantes (raça Nelore) no qual avaliaram a utilização de 100 mg de P₄ de curta ação em associação com o implante de P₄ em protocolo de ressincronização iniciado aos 14 dias após a primeira inseminação e concluíram que a P₄ apresenta taxas de gestação na ressincronização satisfatórias. Com base no exposto, sugere-se que a utilização da associação do implante intravaginal de P₄ com uma aplicação de P₄ injetável pode ser utilizada em programas de ressincronização super precoce em vacas lactantes e não lactantes, apresentando taxas de gestação satisfatórias.

Um dos primeiros estudos utilizando o implante intravaginal de P₄ foi descrito por Mcmillan e Macmillan, (1989) em que sugeriram que o tratamento com o implante de progesterona (1,9 g de P₄) por 14 dias em novilhas seria o recomendado para que se obtivesse sincronia da manifestação do estro e taxas de gestação dentro do limite esperado. Utilizando um período de tratamento mais curto, Van Cleeff et al., (1996) obtiveram resultados positivos quando utilizaram o implante intravaginal com 1,38 g de P₄ por 5 dias na ressincronização iniciada aos 17 dias após a primeira inseminação em novilhas de leite (raça Holandesa). Os autores observaram que a P₄ sincroniza a manifestação do estro nas novilhas não gestantes, sem prejudicar as taxas de concepção da primeira inseminação, quando comparadas ao grupo controle (VAN CLEEFF et al., 1996). Na ressincronização aos 13 dias a utilização do implante de P₄ por 7 dias em vacas de leite, sincronizou a manifestação do estro para dois dias após a remoção do implante enquanto no grupo controle (sem tratamento) a manifestação foi distribuída ao longo de 7 dias (EL-ZARKOUNY; STEVENSON, 2004). Quanto a taxa de sobrevivência embrionária entre o DG realizado aos 29 e 57 dias após a IA, a taxa foi superior no grupo tratado com P₄ (65,5%) que no grupo controle (44,3%) (EL-ZARKOUNY; STEVENSON, 2004). Resultado semelhante foi descrito em estudo por Colazo et al., (2006) em novilhas (raça Angus), no qual concluíram que a utilização de implante de P₄ por 7 dias na

ressincronização aos 13 dias aumenta as taxas de concepção em comparação ao grupo sem tratamento (COLAZO et al., 2006). Portanto, a utilização do implante intravaginal de P₄ na ressincronização super precoce é segura para fêmeas gestantes e aumenta as taxas de concepção nas novilhas não gestantes, contudo o potencial da progesterona para aumentar as taxas de concepção ainda não foi totalmente explorado. A utilização de progesterona seja via dispositivo intravaginal ou injetável, sem a administração de estrógenos, em protocolos de sincronização (CAVALIERI et al., 2003) e ressincronização (CAVALIERI et al., 2008) da onda folicular em vacas de leite apresenta capacidade de sincronização variável de indução da onda folicular. Isto sugere que as doses de P₄ comumente utilizadas podem não ser altas o suficiente por tempo suficiente de exposição para induzir o recrutamento de novas ondas foliculares em todos os animais tratados (CAVALIERI, 2018). Por outro lado, Cavalieri, (2018) observou que o tratamento com 6,24 g de P₄ na forma de implante intravaginal por 3 dias, induz a sincronização da emergência de nova onda folicular para 2 a 3 dias após o tratamento. Sendo que, para o tratamento foram utilizados dois dispositivos intravaginais por animal, que eram compostos por um suporte livre de P₄ em formato de “Y” no qual eram encaixados quatro insertos de silicone impregnados com 0,78 g de P₄. Sabe-se que a progesterona é capaz de induzir a sincronização da onda folicular, contudo faz-se necessário mais estudos acerca da dose de P₄ ideal para utilizar em protocolos de ressincronização super precoce em novilhas de corte.

2.3 Doppler

No âmbito da fisiopatologia da reprodução, a ultrassonografia é uma ferramenta usada para investigar o trato reprodutivo feminino das espécies domésticas (GINTHER, 2014). Mais especificamente, esta técnica tem sido utilizada para avaliação uterina, diagnóstico de gestação, determinação do sexo fetal e detecção da ovulação (MATSUI; MIYAMOTO, 2009) e, em conjunto com a manipulação do ciclo estral, facilitou a disseminação da inseminação artificial (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

O Color Doppler é o modo de avaliação ultrassonográfica através do qual se cria um mapa de cor baseado na velocidade e direção do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2014), onde normalmente tons de vermelho indicam fluxo em direção ao transdutor e tons de azul fluxo na direção oposta (MCDICKEN; ANDERSON, 2002). Após o significativo avanço da utilização

nas avaliações ginecológicas humanas (BHAL et al., 1999), o Color Doppler foi introduzido às biotécnicas da reprodução bovina, com o objetivo específico de avaliar a vascularização das estruturas ovarianas, folículos e corpo lúteo (ACOSTA et al., 2002; HERZOG; BOLLWEIN, 2007; MATSUI; MIYAMOTO, 2009; GINTHER, 2014). O uso do Color Doppler na reprodução bovina iniciou no Japão com trabalhos que avaliavam as alterações na vascularização do corpo lúteo e folículos (ACOSTA et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2006). Foi demonstrado, por exemplo, que antes da ovulação há um aumento da perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório (ACOSTA et al., 2003). Adicionalmente, o uso do Color Doppler possibilitou identificar que folículos pré-ovulatórios com maior vascularização apresentam maiores concentrações de estradiol intrafolicular (VARUGHESE et al., 2014) e estão associados a maiores taxas de gestação (SIDDIQUI; ALMAMUN; GINTHER, 2009).

O corpo lúteo é a principal glândula produtora de progesterona, e tem sua funcionalidade associada às flutuações endócrinas do ciclo estral de bovinos (NISWENDER et al., 2000). Tanto a área (D'OCCHIO et al., 1999) quanto o fluxo sanguíneo (MIYAMOTO et al., 2005; LÜTTGENAU et al., 2011) e a ecogenicidade (MIYAMOTO et al., 2005) do CL estão fortemente correlacionados às concentrações plasmáticas de P₄ durante a gestação (HERZOG et al., 2011; KAYA et al., 2017). Neste sentido, o Color Doppler tem sido utilizado para selecionar receptoras de embrião com base na avaliação da vascularização do corpo lúteo e endométrio bovino e sua relação com o potencial de sucesso gestacional (KANAZAWA et al., 2016). Ainda, há relatos em bovinos de corte (*Bos indicus* e *Bos taurus*) que estabeleceram um método diagnóstico para detecção de fêmeas não gestantes a partir da redução da perfusão sanguínea e área do CL em vacas medida por ultrassonografia em modo Doppler (PUGLIESI et al., 2014b; KANAZAWA et al., 2016).

A avaliação da vascularização por ultrassonografia em modo Doppler pode ser realizada de forma subjetiva ou objetiva (GHETTI et al., 2012; ARASHIRO et al., 2013; VIANA et al., 2013; TARSO et al., 2016). Existem variações metodológicas quanto à forma para estabelecer o grau de vascularização que não serão exploradas neste documento. No método subjetivo o operador treinado estima a porcentagem das regiões coloridas, em torno da região de interesse, folículo ou corpo lúteo (TARSO et al., 2016). A vantagem desse método é o fato de estimar a vascularização em tempo real. Entretanto, análises comparativas entre diferentes grupos experimentais podem ser prejudicadas pela incapacidade de avaliar com precisão pequenas alterações no fluxo sanguíneo ao longo do tempo (CAUNCE, 2017). Adicionalmente, caracterizar estruturas tridimensionais por meio de uma imagem

bidimensional em movimento na tela do ultrassom torna-se um processo desafiador (CAUNCE, 2017). O método objetivo para avaliar a vascularização consiste em exportar as imagens do ultrassom para que as mesmas sejam analisadas em um computador através de um software (ImageJ, Adobe Photoshop, VOCAL, etc.), a fim de quantificar a área das regiões coloridas em número de pixels ou na escala métrica (mm^2 , VARUGHESE et al., 2014; KAYA et al., 2017). Para a utilização deste método faz-se necessário capturar imagens obtidas a partir de diferentes cortes da região de interesse para permitir melhor representação da estrutura investigada (KAYA et al., 2017). Ao comparar o método subjetivo de avaliação da vascularização com o método objetivo, quando realizado por pessoal treinado, não houve diferença entre os métodos (KAYA et al., 2017).

Com base no exposto, Pugliesi et al., (2014a) propuseram a utilização do Color Doppler como ferramenta de diagnóstico de gestação em fêmeas bovinas. A partir da avaliação da vascularização e área do corpo lúteo é possível identificar as fêmeas não gestantes com 100% de sensibilidade e 80-91% de acurácia a partir de 20 dias pós-IATF (PUGLIESI et al., 2014b). Por este método, são consideradas não gestantes as fêmeas que apresentarem durante a avaliação ultrassonográfica ovariana, corpo lúteo com área inferior a 2 cm^2 e perfusão sanguínea menor de 25%. A percentagem da perfusão sanguínea é avaliada subjetivamente através da divisão da área do CL em duas, central e periférica, sendo cada área responsável por 50% da perfusão total (PUGLIESI et al., 2014b). Estudo mais recente, realizado em ovelhas descreve o Color Doppler como um método eficaz de diagnóstico de gestação a partir dos 17 dias pós-cobertura (ARASHIRO et al., 2018). Devido à possibilidade de utilização do Color Doppler como método precoce de diagnóstico de gestação em bovinos (MATSUI; MIYAMOTO, 2009; PUGLIESI et al., 2017), a implementação de um protocolo de ressincronização da ovulação, visando oportunidades precoces adicionais de inseminação artificial em tempo fixo, torna-se viável.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar a eficiência de um protocolo de ressincronização utilizando P₄ injetável (P₄Inj) associada ao dispositivo intravaginal de P₄ no início da ressincronização realizada aos 14 dias àquela do benzoato de estradiol (BE) associado ao dispositivo intravaginal de P₄ em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar o efeito da suplementação com 75 mg de P₄Inj ao da suplementação com 1 mg de BE no início da ressincronização aos 14 dias pós-inseminação em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*, sobre:

- O diâmetro do folículo dominante no dia 22;
- As taxas de gestação do D22 e D40 (primeira IATF) e as perdas gestacionais ocorridas entre os dias 22 e 40;
- As taxas de gestação da segunda IATF, medidas no dia 54.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido para publicação no periódico **Theriogenology**.

Fertility in response to resynchronization using long-acting injectable progesterone or estradiol benzoate at 14 days post-TAI in *Bos taurus* x *Bos indicus* beef heifers

ABSTRACT

The objective of this work was to compare the pregnancy rates of *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers resynchronized 14 days after the first TAI with long-acting injectable progesterone (iP₄) associated with the intravaginal P₄ device to those resynchronized by the association of estradiol benzoate (EB) and intravaginal P₄ device. Six hundred and seventy-seven heifers (Braford and Brangus) submitted to a TAI cycle (D0) were used. On D14, the animals received a P₄ intravaginal device (1 g, Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP) and were randomly divided into two groups to receive: EB (1 mg I.M., Sincrodiol, Ourofino; n=339); or iP₄ (75 mg I.M., Injectable Sincrogest, Ourofino; n=338). On D22, the P₄ devices were removed and the pregnancy diagnosis (PD) performed by assessing morphological luteolysis through Doppler ultrasound examination. Heifers considered non-pregnant (NP) had the diameter of the dominant follicle (DF) measured and received 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP, Ourofino), 250 µg of sodium cloprostenol (Sincrocio, Ourofino) and 200 IU eCG (SincroeCG, Ourofino), followed by the second TAI on D24. The statistical model was adjusted for each dependent variable by logistic regression analysis (PROC GLIMMIX, SAS version 9.2) considering the following independent variables: treatment, race, age, ranch, and interactions treatment x ranch, treatment x race, treatment x age. The diameter of the DF on D22 in the NP heifers did not differ (P>0.05) between the EB (9.77 ± 0.25) and iP₄ (9.92 ± 0.22) groups. No difference was observed between the EB and iP₄ groups for pregnancy rate on D22 (56.3%, 191/339 versus 60.1%, 203/338, respectively), and D40 post-TAI (49.6%, 168/339 versus 53.3%, 180/338, respectively). The rate of pregnancy losses from PD22 to PD40 was similar between the EB (12%, 23/191) and iP₄ (11.3%, 23/203) groups. The resynchronization pregnancy rate of the iP₄ group (31.85%, 43/135) was lower than that of the EB group (45.95%, 68/148). In conclusion, it is proposed that supplementation with 1 mg EB or 75 mg of iP₄ in combination with the P₄ device at 14 days after TAI is equally safe for the ongoing pregnancy. Additionally, whereas the resynchronization of the follicular wave by the association of EB

and intravaginal P₄ device reaches satisfactory pregnancy rates to the second TAI, complementary studies are necessary to investigate the apparent low pregnancy rates obtained by the association of iP₄ and P₄ device.

Keywords: early resynchronization; injectable progesterone; estradiol benzoate

1. Introduction

In the continuous search for the intensification of reproductive programs, resynchronization protocols seek to increase reproductive efficiency by reducing the interval between inseminations. Considering that the estrous cycle of females submitted to timed-artificial insemination (TAI) programs is synchronized, the resynchronization of the non-pregnant ones for a second AI represents an opportunity to improve reproductive efficiency. Therefore, it is possible to implement super-early resynchronization protocols in heifers at the beginning of the reproductive season, so that they will be among the first females calving, and will have an adequate amount of time for uterine involution and preparation for a new pregnancy on the following season [1,2].

Pharmacological manipulation of resynchronization protocols, when performed prior to the pregnancy diagnosis, may interfere with processes associated with maternal recognition of pregnancy and cause reabsorption of the conceptus in pregnant females. For example, the use of estradiol in resynchronization protocols initiated on days 13 and 14 after insemination (TAI) in beef and dairy heifers increased the concentrations of circulating prostaglandin F₂ alpha metabolite and reduced progesterone (P₄) concentrations, suggesting a negative impact on pregnancy due to compromised CL functionality [3,4]. Macmillan et al., [5] have demonstrated that the use of a low dose of estradiol benzoate (EB) on resynchronization performed between 12 and 14 days after TAI synchronizes the manifestation of estrus to 9-10 days after the EB application without interfering with the pre-existing pregnancy. The use of 1 mg of EB with a P₄ intravaginal device at 13 days after TAI has been demonstrated to synchronize the development of the ovulatory follicle [6], increase the rates of return to estrus [7], and the rates of pregnancy [4] in cows. However, scarce information is available on the use of EB on super early resynchronization of beef heifers.

Although estradiol has been widely and successfully employed in synchronization and resynchronization programs, limitations of its use in countries such as the USA impair further advancement of such programs that optimize the use of TAI. Therefore, alternative approaches are necessary to the use of estradiol in reproductive programs.

It has been known that different progesterone formulations and concentrations have been used to synchronize and resynchronize the emergence of the a follicular wave [8–10]. Colazo et al., [11] reported that the use of 150 mg of injectable progesterone on resynchronization of cows at 13 days post-AI does not synchronize the emergence of a new follicular wave, whereas more recent studies indicated that the use of 75 mg of long-acting, or 100 mg of short-acting injectable progesterone 12 to 14 days post-AI improved estrus manifestation and pregnancy rates in cows [12]. Despite existing data supporting P₄ alone as a follicular wave emergency synchronization agent in cows, particularities regarding its use in different animal categories, and pharmacokinetic properties according to specific formulations have not been widely explored. Current information suggests that additional studies are essential for optimizing the use of long-acting progesterone and estradiol benzoate towards the successful synchronization of the follicular wave emergence, without negatively interfering neither with the established pregnancy, nor with the subsequent ovulatory process [8, 13]. Based on this, the objective of the present study was to compare the efficiency of P₄ long-acting injectable (iP₄) associated with the intravaginal device of P₄ to that of estradiol benzoate (EB), at the beginning of resynchronization performed at 14 days in *Bos taurus* x *Bos indicus* heifers.

2. Material and methods

2.1. Animals

This experiment was conducted on seven commercial beef ranches located in Southwest Brazil, from October of 2018 to February of 2019. The study was carried out on 677 crossbred *Bos taurus* x *Bos indicus* beef heifers (Braford and Brangus), between 24 and 26 months old. The study was approved by the Committee for Ethics in Animal Use of the Federal University of Pampa (protocol 029/2018).

2.2. Experimental design and animal handling

The heifers had the ovulation synchronized based on EB and P₄ treatments for TAI, according to the conventional protocol used in each farm. The day of the first TAI was considered as D0. Fourteen days after TAI, the animals received a new intravaginal P₄-releasing device (1 g of P₄, Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil) for eight days, and were randomly divided to receive one of the following two treatments: estradiol benzoate (EB), or long-acting injectable progesterone (iP₄), the protocol illustrated on Figure 1. The EB group (n = 339) received an im injection of 1 mg estradiol benzoate (Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal) and the iP₄ group (n = 338) received an im injection of 75 mg long-acting P₄ (Sincrogest Injetável, Ourofino Saúde Animal).

On Day 22, the P₄ device was removed and the pregnancy diagnosis (PD) was performed by assessment of the CL function by measuring CL blood flow through Doppler ultrasound examination. Females determined as non-pregnant received im doses of 250 µg of prostaglandin F₂ alpha (PGF) analogue (Sincrocio, Ourofino Saúde Animal), 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG, SincroCG, Ourofino Saúde Animal; im) and 1 mg of estradiol cypionate (EC, SincroCP, Ourofino Saúde Animal; im), and were submitted to a second insemination on D24. The females detected with a functional CL on D22 were considered pregnant, removed from the study, and later submitted to a confirmatory PD 40 days after first insemination.

2.3. Ultrasound scanning

As shown on Figure 1, the ovarian ultrasound examinations were performed using a duplex B-mode and pulse-wave color Doppler ultrasound instrument (MyLab30 Vet Gold; Esaote Healthcare) and multifrequency linear transducer. On Day 22, the ultrasound examination on B-mode was used to measure the diameter of the largest follicle observed (dominant follicle, DF) by sampling in non-pregnant heifers. Blood perfusion of the CL was assessed, by estimating the proportion of the CL area with colored signs of active blood flow in relation to its total area, as previously described [12,13]. Females were considered non-pregnant when CL blood perfusion was lower than 25% [12]. Confirmatory PD was performed on days 40

and 54 after the first AI by B-mode ultrasound examination. Females were considered pregnant when uterine fluid accumulation and presence of the embryo were detected.

2.4. Statistical analyses

The data of the 195 DF diameters on D22 were analyzed by the Shapiro-Wilk test for normality and compared between groups (EB, n= 98 and iP₄ n= 97) by the Student's t test for independent samples (IBM SPSS Statistic 20). Pregnancy rate data for days 22, 40 and 54 were analyzed by logistic regression analysis, and the statistical model was adjusted for each dependent variable (PROC GLIMMIX, SAS Institute Inc. Version 9.2). The following independent variables were considered to the final statistical models: treatment, breed, age, ranch and treatment x ranch, treatment x breed, treatment x age interactions. Non-significant independent variables were removed to increase the statistical power of the analysis. Probabilities values ≤ 0.05 for comparisons of means were considered statistically significant.

3. Results

For each dependent variable, an initial statistical model was performed containing all the independent variables analyzed (Table 1). For the final statistical model a new analysis was performed containing only the variables that presented significant impact in the initial model, with the aim of increasing the statistical power of the analysis. For pregnancy rate at 22 days the final model included the effect of treatment and ranch; for the pregnancy rate at 40 days the effects of treatment, ranch, and interaction between treatment x ranch were considered; for the resynchronization pregnancy rate (54 days) only the effect of treatment composed the model.

The diameters of 195 dominant follicles of non-pregnant heifers on D22 were measured. On group EB (n = 98), the average dominant follicle diameter was 9.77 ± 0.25 , whereas on group iP₄ (n = 97) the average dominant follicle diameter was 9.92 ± 0.22 , with no significant difference observed between the two groups (P = 0.068).

Pregnancy rates on days 22, 40 and 54 according to ranches are described on Table 2. No significant differences were observed between the groups for pregnancy rates on D22 (Figure 2A); the EB group presented pregnancy rates on D22 of 56.3% (191/339) and the iP₄ group 60.1% (203/338). Pregnancy rates on D40 did not differ significantly between groups (Figure 2A); in the EB group the rates were 49.6% (168/339) and in the iP₄ group 53.3% (180/338). The rate of pregnancy loss was determined by the difference between the pregnancy rate on D22 and that on D40 (Figure 2B), and no significant differences were observed between groups ($P > 0.05$); in the EB group, the rate of pregnancy loss was 12% (23/191) and in the iP₄ group 11.3% (23/203).

The pregnancy rate on D54 (i.e. resynchronization pregnancy rate; Figure 3A) was higher ($P = 0.01$) on the EB group (45.9%; 68/148) in comparison to the iP₄ group (31.8%; 43/135). There was no significant difference ($P > 0.05$) between the groups regarding cumulative pregnancy rates (i.e. PD40 plus PD54 pregnancy rates; Figure 3B), with the EB group reaching 69.6% (236/339) and the iP₄ group reaching 65.9% (223/338).

4. Discussion

Whereas the use of estradiol as a synchronizing agent is well-established in specific conditions, its use, as well as that of injectable progesterone in super-early resynchronization has been the focus of investigations to identify optimal doses, according to the animal category, that neither interfere with pre-established pregnancy nor impair the subsequent ovulation. Our work aimed to compare pregnancy rates of resynchronization protocols initiated at 14 days post-AI using long-acting injectable progesterone (iP₄) associated with intravaginal P₄ device to those of estradiol benzoate (EB)-based protocols in crossbred beef heifers. We identified that iP₄ and EB differed as to the resynchronization pregnancy rates (D54), whereas no impact was observed on pregnancy rates of the first TAI (D22 and D40). In addition, our dominant follicle diameter data did not differ between groups. Dominant follicle diameter was measured on a subset of the animals ($n = 195$) and the borderline non-significant *p-value* (0.068), although the sample size cannot be considered small, might denote a difference in DF diameter in an expanded sample size.

One of the caveats of exposing pregnant females to EB or P₄ during early pregnancy is the possible interference with maternal recognition of pregnancy. In general, pregnancy rates of

the first insemination range from 40 to 60% [7,14,15] according to the animal category and the hormonal protocol used. Considering the potentially detrimental effects of the resynchronization protocol on ongoing pregnancies, pregnancy rates reported in the current study are within the expected range for the first timed AI (TAI). In super-early resynchronization protocols, pregnancy rates of the first TAI with the influence of the use of EB range from 40 to 45% [4,7], thus our data on pregnancy rates on D22 (56.3%; 191/339) and on D40 (49.6%; 168/339) are above the limit cited in the literature. In super-early resynchronization protocols in which progesterone is used, there is a wide variation in pregnancy rates, according to the dose and formulation of P₄ used. Overall, the pregnancy rate ranges from 28 to 67% [16,17], thus considering that our pregnancy rates in D22 (60.1%; 203/338) and D40 (53.3%; 180/338) are within the mentioned limit. Our data from pregnancy rates of the first TAI in resynchronization protocol using P₄ intravaginal device associated with EB or injectable progesterone suggest that the treatments do not affect negatively the ongoing pregnancy in beef heifers. It is known that the increase in P₄ concentration between days 3 and 8 after ovulation increases conception rates in heifers [18], assists in embryo elongation [19] and accelerates histotroph production [20,21]. An indirect uterine effect from the iP₄ treatment may partially support the numerically different pregnancy rates between the EB and iP₄ groups to the first TAI. However, based on the lack of statistical difference between EB and iP₄ groups, our data suggest that both agents used in resynchronization protocols starting at 14 days post-TAI have no significant impact on the ongoing pregnancy.

Pregnancy loss was assessed by calculating the difference between the pregnancy rate on D22 (Doppler) and pregnancy rate on D40 (mode B) after the first TAI. Identifying not pregnant females by assessing morphological CL regression through the Doppler ultrasound examination has been widely accepted [12,22]; however it is acknowledged that this pregnancy loss variable may be partially confounded with false positive pregnancy diagnosis on D22. In the context of the current study we are concerned about a potential negative impact of either treatment on the ongoing pregnancies. From 19 to 32 days after TAI, gestational losses range from 19.8% to 31.5% [23,24]. Based on this, our data suggest that the exposure of pregnant beef heifers to both iP₄ and EB had a similar impact on pregnancy loss, and are within acceptable ranges. Additionally, the overall pregnancy loss of 11.7% in our study, which is also within the expected range of losses, further supports the conclusion that neither protocol affected negatively the ongoing pregnancy.

Previous studies using 1 mg of EB on resynchronization protocols beginning at 13 days post-TAI reached pregnancy rates from 33.1% to 52.1% [4,7]. Our pregnancy rates of 45.95% (68/148) have been compatible with those reported on the literature. It is known that the EB is linked to the mechanism of luteolysis [25,26], therefore its use in super early resynchronization protocols could be harmful to pregnant females of the first TAI. Pregnancy rates reported herein indicate that the use of EB in resynchronization at 14 days post-TAI in beef heifers reaches pregnancy rates within acceptable rates. The results of this work plus other data from our research group [27] contribute to the consolidation of the EB as a follicular wave resynchronize agent in heifers.

In super early resynchronization protocols, the pregnancy rates of the second TAI vary according to the dose and formulation of P₄ used, ranging between 35 and 60.9% [16,17]. Pregnancy rates in the resynchronization of the iP₄ group were at the lower limit of the aforementioned range. The possibility of high progesterone concentrations blocking the emergence of the new follicular wave was discarded based on a number of studies that have proven the efficiency of P₄ in inducing follicular emergence [4,8,16], reaching higher pregnancy rates in other animal categories. Also, similar diameter of the DFs at day of P₄ removal suggest both groups had a similar follicular growth dynamics. On the other hand, long-acting P₄ used in the current study may have not been fully metabolized to the point of leaving residues that interfered with the subsequent ovulation process of heifers. In that regard, additional experiments will be performed to verify the potential negative effect of injectable P₄ on ovulation.

Although cumulative pregnancy rates were not different between both groups (EB, 69.62% vs. iP₄, 65.98%), pregnancy rates to the second TAI (i.e. resynchronization rates) were greater in the EB group. Our data indicate that in super-early resynchronization starting at 14 days after the first TAI in beef heifers, the association of 1 mg of EB and P₄ device intravaginal provides pregnancy results as expected, possibly due to adequate synchronization of the follicular wave, without negatively impacting the pregnancy in the establishment of the first TAI. On the other hand, whereas the use of 75 mg of long-acting injectable progesterone associated with intravaginal P₄ device does not negatively impact the ongoing pregnancy, a negative impact on the resynchronization pregnancy rates was observed. We hypothesize that the dose of long-acting P₄ used may be interfering with the subsequent ovulation and thus impacting the results of the second TAI. Such results warrant further experiments to test this

hypothesis by measuring circulating P₄ and monitoring the follicular dynamics of the heifers during the resynchronization protocol.

REFERENCIAS:

- [1] Beretta V, Lobato Piva FJ, Mielitz Netto GCA. Produtividade e Eficiência Biológica de Sistemas Pecuários de Cria Diferindo na Idade das Novilhas ao Primeiro Parto e na Taxa de Natalidade do Rebanho no Rio Grande de Sul 1 Productivity and Biological Efficiency of Beef Cow-Calf Systems Differing in Age. *Rev Bras Zootec* 2001;30:1278–86. doi:10.1590/S1516-35982001000500022.
- [2] Pötter L, Lobato JFP, Mielitz Netto CGA. Análises Econômicas de Modelos de Produção com Novilhas de Corte Primíparas aos Dois , Três e Quatro Anos de Idade. *Rev Bras Zootec* 2000;29:861–70. doi:10.1590/S1516-35982000000300032.
- [3] Munro RK, Moore NW. Effects of progesterone , oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. *J Reprod Fertil* 1985;73:353–9.
- [4] El-Zarkouny SZ, Stevenson JS. Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. *J Dairy Sci* 2004;87:3306–21. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73467-0.
- [5] Macmillan KL, Taufa VK, Day AM, Eagles VM. Some effects of post-oestrous hormonal therapies on conception rates and resubmission rates in lactating dairy cows. *BSAP Occas Publ* 2001;26:195–208. doi:10.1017/S0263967X00033681.
- [6] Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J Anim Sci* 2000;78:145. doi:10.2527/2000.781145x.
- [7] Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, Richardson-Adams AM, Lamb GC. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen , progesterone , or both. *J Anim Sci* 2003;81:1681–92. doi:10.2527/2003.8171681x.
- [8] Cavalieri J. Effect of treatment of *Bos indicus* heifers with progesterone 0 , 3 and 6 days after follicular aspiration on follicular dynamics and the timing of oestrus and ovulation. *Anim Reprod Sci* 2018;193:9–18. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.026.

- [9] Cavalieri J, Smart VM, Hepworth G, Ryan M, Macmillan KL. Ovarian follicular development and hormone concentrations in inseminated dairy cows with resynchronized estrous cycles. *Theriogenology* 2008;70:946–55. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.057.
- [10] Cavalieri J, Hepworth G, Parker KI, Wright PJ, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2003;76:177–93. doi:10.1016/S0378-4320(02)00260-9.
- [11] Colazo MG, Kastelic JP, Small JA, Wilde RE, Ward DR, Mapletoft RJ. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *Can Vet J* 2007;48.
- [12] Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy?1. *Biol Reprod* 2014;91:1–12. doi:10.1095/biolreprod.114.121525.
- [13] Pugliesi G, de Melo GD, Ataíde GA, Pellegrino CAG, Silva JB, Rocha CC, et al. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: Feasibility and field results. *Anim Reprod* 2018;15:239–46. doi:10.21451/1984-3143-AR2018-0059.
- [14] Marques MO, Morotti F, Silva CB, Júnior MR, Silva CP, Baruselli PS, et al. Influence of category - heifers, primiparous and multiparous lactating cows - in a large-scale resynchronization FTAI program. *J Vet Sci* 2015;16:367–71.
- [15] Sá Filho MF, Marques MO, Girotto R, Santos FA, Sala R V., Barbuio JP, et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology* 2014;81:284–90. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.027.
- [16] Colazo MG, Kastelic JP, Mainar-jaime RC, Wilde RE, Veira DM, Mapletoft RJ. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins 2006;65:557–72. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.06.001.
- [17] Pugliesi G, Bisinotto DZ, Mello BP, Lahr FC, Ferreira CA, Melo GD, et al. A novel

- strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed-inseminations within 22 days. *Reprod Domest Anim* 2019;rda.13475. doi:10.1111/rda.13475.
- [18] Diskin M, Morris D. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008;43:260–7. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x.
- [19] Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, et al. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:368. doi:10.1071/RD07204.
- [20] O’Hara L, Forde N, Carter F, Rizos D, Maillo V, Ealy AD, et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2014;26:328–36. doi:10.1071/RD12370.
- [21] Batista EOS, Cardoso BO, Oliveira ML, Cuadros FDC, Mello BP, Sponchiado M, et al. Supplemental progesterone induces temporal changes in luteal development and endometrial transcription in beef cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2019;68:126–34. doi:10.1016/j.domaniend.2019.02.001.
- [22] Pugliesi G, Dalmaso de Melo G, Silva JB, Carvalhêdo AS, Lopes E, de Siqueira Filho E, et al. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 2019;135:73–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.006.
- [23] Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP. Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. *J Anim Sci* 1994;72:16–30. doi:10.2527/1994.72suppl_316x.
- [24] Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2016;86:239–53. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.037.
- [25] Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC, Palha MM, Beg MA, Wiltbank MC. Role of Follicular Estradiol-17beta in Timing of Luteolysis in Heifers 1. *Biol Reprod*

- 2009;437:426–37. doi:10.1095/biolreprod.108.073825.
- [26] Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 2001;122:965–79. doi:10.1530/rep.0.1220965.
- [27] Motta IG, Rocha CC, Bisinotto DZ, Melo GD, Júnior GAA, Silva AG, et al. Increased pregnancy rate in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. *Theriogenology* 2020;147:62–70. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.009.

Table 1. P values of independent variables used in the statistical model for each dependent variable.

	PD 22	PD 40	PD 54
Treatment	0.2382*	0.3543*	0.0152*
Breed	0.4852	0.4932	0.5309
Age	0.8741	0.9245	0.8833
Ranch	0.0022*	0.0001*	0.9796
Treatment x Ranch	0.1863	0.0454*	
Treatment x Breed	0.9766	0.7108	0.6788
Treatment x Age	0.3568	0.8106	0.9959

*Variables maintained in the final statistical model.

Table 2. Descriptive analyses according to ranch location

Ranch	N° of heifers	Pregnancy rates (%)					
		D22		D40		D54	
		EB	iP₄	EB	iP₄	EB	iP₄
A	82	51.22	68.29	36.58	60.97	50	30.77
B	119	62.71	78.33	61.02	76.67	45.45	38.46
C	119	61.02	56.67	55.93	51.67	47.83	30.77
D	39	35	36.84	35	21.05	53.85	33.33
E	77	52.50	70.27	40	59.46	42.11	27.27
F	144	61.11	55.56	54.17	45.83	39.29	31.25
G	97	52.08	42.86	45.83	38.78	47.83	32.14

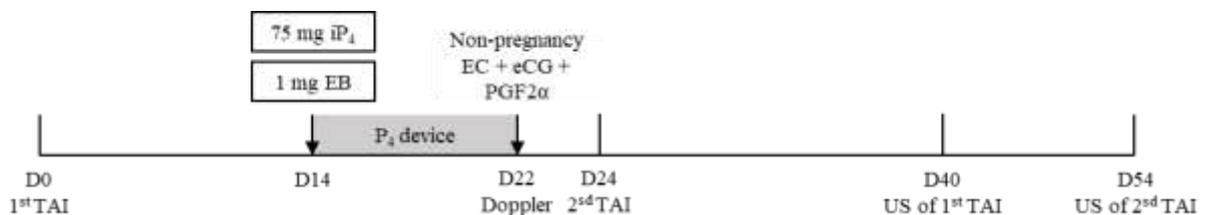


Figure 2. Experimental Design. Six hundred and seventy-seven heifers submitted to TAI were randomly divided into two treatment groups on D14 post AI: EB group (device P₄ plus 1 mg of estradiol benzoate, n = 339), and iP₄ group (device P₄ plus the application of 75 mg of long-acting injectable progesterone, n = 338). The pregnancy diagnosis was performed on the D22 along with the removal of the P₄ device, pregnant heifers were removed from the study and pregnancy status verified on D40. Whereas non-pregnant heifers received doses of 1 mg of estradiol cypionate (EC), 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 250 µg of prostaglandin F2 alpha analogue (PGF2α), were inseminated a second time on D24, and their pregnancy was verified on D54. TAI - fixed-time artificial insemination; Doppler - doppler ultrasound examination; US - ultrasound examination on B-mode

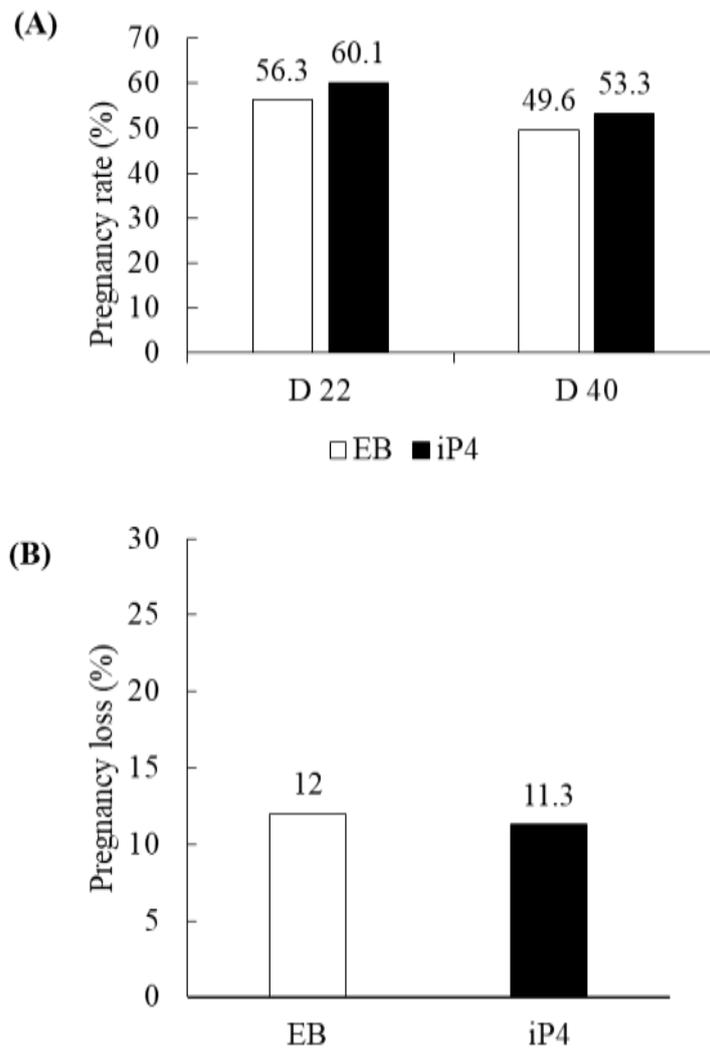


Figure 3. Pregnancy data of the first timed AI (TAI) and impact of the resynchronization protocols. A) Pregnancy rates on D22 and D40; B) Pregnancy loss between the first and second pregnancy diagnosis. Data from the first TAI of heifers submitted to a resynchronization protocol 14 days after first TAI and treated with 1 mg estradiol benzoate (EB, white bar) or with 75 mg long-acting injectable progesterone (iP4, black bar) at the time of P4 device insertion.

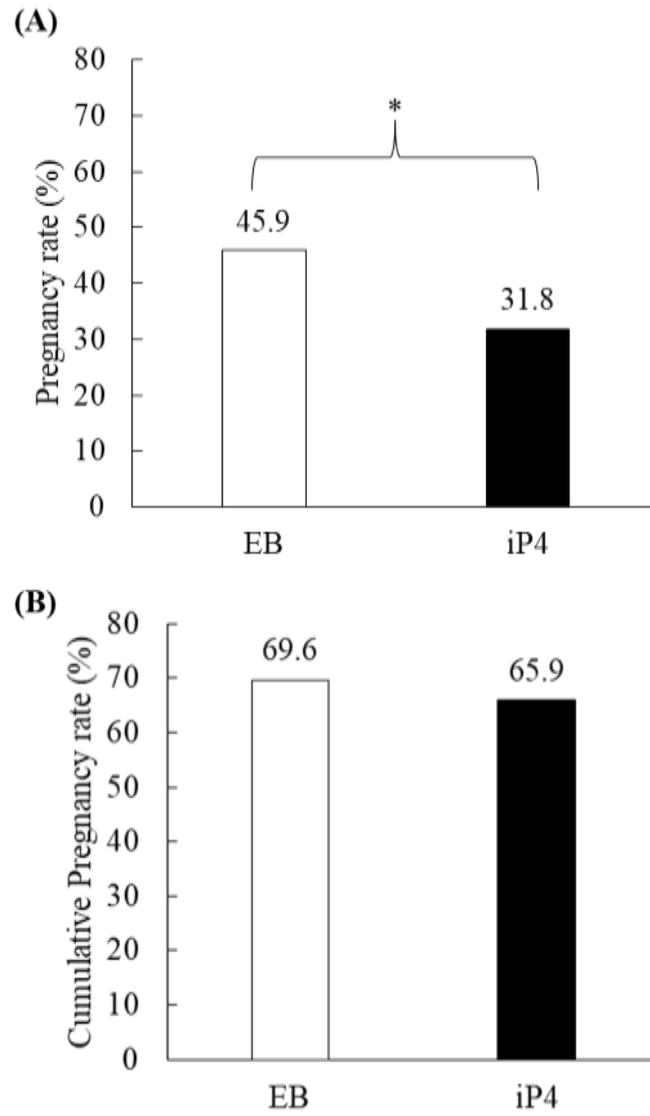


Figure 4. Second timed AI (TAI) and overall pregnancy rates. A) Pregnancy rates on D54; B) Cumulative pregnancy rate. Data from the second TAI of heifers submitted to a resynchronization protocol 14 days after first TAI and treated with 1 mg estradiol benzoate (EB, white bar) or with 75 mg long-acting injectable progesterone (iP4, black bar) at the time of P4 device insertion. *P<0.05

5 CONCLUSÕES

Ambos os tratamentos, benzoato de estradiol e progesterona injetável de longa ação, quando utilizados na ressincronização iniciada as 14 dias após a inseminação:

- Impactam de maneira semelhante a gestação em curso;
- Apresentam taxas de perdas gestacionais no diagnóstico de gestação com o Doppler abaixo do limite inferior esperado, que não são diferentes entre os grupos;
- E, apresentaram taxas de gestação cumulativas maior que a média nacional.

Quanto às taxas de gestação da ressincronização, enquanto o benzoato de estradiol apresenta taxas dentro do limite esperado, contribuindo para sua consolidação como agente de ressincronização super precoce, a progesterona injetável de longa ação, na dose utilizada e categoria animal testada, apresenta uma limitação quando utilizada na ressincronização.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, as perspectivas futuras envolvem avaliar os efeitos do tratamento com 75 mg de P₄Inj:

- Nas concentrações séricas de progesterona;
- E na dinâmica folicular durante a ressincronização super precoce (D14 – D24).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 651–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870071>>.

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 759–767, 2003.

ALMEIDA, M. R. De et al. Efeito da aplicação de benzoato de estradiol ou da Gonadotrofina Coriônica humana em protocolos de ressincronização da ovulação sobre a prenhez da IATF Effects of Estradiol Benzoate or Human Chorionic Gonadotropin for Ovulation Resynchronization Protocols. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. October, p. 1–6, 2015.

ANDERSON, L. H.; DAY, M. L. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2955–2961, 1 nov. 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/72/11/2955-2961/4632569>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

ANDRADE, B. H. de A. et al. EFICIÊNCIA DO CIPIONATO DE ESTRADIOL E DO BENZOATO DE ESTRADIOL EM PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DA OVULAÇÃO SOBRE A DINÂMICA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS NELORE INSEMINADAS EM DIFERENTES MOMENTOS. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 70–82, 2012.

ARASHIRO, E. K. N. et al. Three-dimensional modeling of color Doppler images : a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 662–669, 2013.

ARASHIRO, E. K. N. et al. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. **Theriogenology**, v. 106, p. 247–252, 15 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17305113>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

ARAUJO, R. R. et al. Role of Follicular Estradiol-17beta in Timing of Luteolysis in Heifers 1. **Biology of reproduction**, v. 437, n. March, p. 426–437, 2009.

ASBIA, A. B. de I. A. **Index ASBIA 2017**. [s.l: s.n.].

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em Bovinos**. 3^a ed. São Paulo: Rocca, 2006.

BARTOLOME, J. A. et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1643–1658, 2005.

BARUSELLI, P. S. et al. History , evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139–152, 2012.

BARUSELLI, P. S. et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558–571, 2017.

BATISTA, E. O. S. et al. Supplemental progesterone induces temporal changes in luteal development and endometrial transcription in beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 68, p. 126–134, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724019300219>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

BERETTA, V.; LOBATO PIVA, F. J.; MIELITZ NETTO, G. C. A. Produtividade e Eficiência Biológica de Sistemas Pecuários de Cria Diferindo na Idade das Novilhas ao Primeiro Parto e na Taxa de Natalidade do Rebanho no Rio Grande de Sul 1 Productivity and Biological Efficiency of Beef Cow-Calf Systems Differing in Age. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1278–1286, 2001.

BERGFELD, E. G. M. et al. **Changing Dose of Progesterone Results in Sudden Changes in Frequency of Luteinizing Hormone Pulses and Secretion of 17P-Estradiol in Bovine Females' BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/54/3/546/2761799>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BHAL, P. S. et al. The use of transvaginal power Doppler ultrasonography to evaluate the relationship between perifollicular vascularity and outcome in in-vitro fertilization treatment cycles. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 4, p. 939–45, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221224>>. Acesso em: 31 maio. 2018.

BILBY, T. R. et al. Supplemental progesterone and timing of resynchronization on pregnancy

outcomes in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7032–7042, 2013.

BISINOTTO, R. S. et al. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5798–5808, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3516>>.

BISINOTTO, R. S. et al. Meta-analysis of progesterone supplementation during timed artificial insemination programs in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2472–2487, 1 abr. 2015.

BURKE, C. R. et al. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 1, p. 145, 1 jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/78/1/145-151/4625591>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

CARTER, F. et al. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368, 3 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD07204>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

CAUNCE, S. L. **THREE-DIMENSIONAL ANALYSIS OF COLOUR DOPPLER ULTRASOUND IMAGES: THE RELATIONSHIP OF VASCULAR FLOW TO OVARIAN STRUCTURES AND THEIR FUNCTION IN BUFFALO COWS AND BEEF CALVES**. 2017. University of Saskatchewan, 2017. Disponível em: <<https://ecommons.usask.ca/bitstream/handle/10388/7992/CAUNCE-THESIS-2017.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

CAVALIERI, J. et al. COMPARISON OF THREE METHODS OF ACUTE ADMINISTRATION OF PROGESTERONE ON OVARIAN FOLLICULAR DEVELOPMENT AND THE TIMING AND SYNCHRONY OF OVULATION IN EjqS INDICUS HEIFERS. **Theriogenology**, v. 49, p. 1331–1343, 1998. Disponível em: <<http://journal.unair.ac.id/download-fullpapers-ln522cc87c61full.pdf>>.

CAVALIERI, J. et al. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 3–4,

p. 177–193, 2003.

CAVALIERI, J. et al. Ovarian follicular development and hormone concentrations in inseminated dairy cows with resynchronized estrous cycles. **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 946–955, 2008.

CAVALIERI, J. Effect of treatment of *Bos indicus* heifers with progesterone 0, 3 and 6 days after follicular aspiration on follicular dynamics and the timing of oestrus and ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 193, n. October 2017, p. 9–18, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.026>>.

COLAZO, M. G. et al. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. v. 65, p. 557–572, 2006.

COLAZO, M. G. et al. Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. January, 2007.

CREPALDI, G. A. et al. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. **Animal Reproduction Science**, v. 209, 1 out. 2019.

D'OCCHIO, M. J. et al. FACTORS THAT INFLUENCE FOLLICLE RECRUITMENT, GROWTH AND OVULATION DURING OVARIAN SUPERSTIMULATION IN HEIFERS: OPPORTUNITIES TO INCREASE OVULATION RATE AND EMBRYO RECOVERY BY DELAYING THE EXPOSURE OF FOLLICLES TO LH. **Theriogenology**, v. 51, p. 9–35, 1999. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0093691X98002283/1-s2.0-S0093691X98002283-main.pdf?_tid=e175ae8d-9a59-4d56-a5b8-20aaf38ffb26&acdnat=1527777166_b0889688417185afd231acd34d0378e4>. Acesso em: 31 maio. 2018.

DINNY GRAHAM, J.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 4, p. 502–519, 1997.

DISKIN, M.; MORRIS, D. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 260–267, jul. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

DRIOWO, M. A. et al. A comparison of the pharmacokinetic properties of three estradiol

esters. **Contraception**, v. 21, n. 4, p. 415–424, 1980.

EL-ZARKOUNY, S. Z.; STEVENSON, J. S. Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3306–3321, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030204734670>>.

FERRAZ, H. T. et al. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Pubvet**, v. 2, n. 12, 2008.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) CATTLE. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489–1505, 1997.

FLINT, A. P. F.; SHELDRIK, E. L. Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 67, n. 1, p. 215–225, 1983.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Interferon-tau and fertility in ruminants. **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F33–F43, 2017.

FORTUNE, J. E.; VINCENT, S. E. Progesterone Inhibits the Induction of Aromatase Activity in Rat Granulosa Cells in Vitro 1. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1078–1089, 1983.

GARRETT, J. E. et al. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F_{2α} release and the interestrus interval in the bovine. **Prostaglandins**, v. 36, n. 1, p. 85–96, 1988.

GHETTI, A. M. et al. Comparison of objective and subjective methods for evaluating the vascular pattern of the preovulatory follicle using color Doppler. **Animal reproduction (Abstract)**, v. 9, p. 657, 2012.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112–125, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.007>>.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of reproduction and fertility**, v. 87, n. 1, p. 223–230, 1989.

HERZOG, K. et al. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 549–554, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.024>>.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. SUPPL. 2, p. 51–58, 2007.

HUNTER, M. G.; SOUTHEE, J. A. Treatment with progesterone affects follicular steroidogenesis in anoestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 14, n. 4, p. 273–279, 1987.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KANAZAWA, T. et al. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1436–1444, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.001>>.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1269–1278, 1990.

KAWATE, N. et al. Changes of messenger RNAs encoding vascular endothelial growth factor and its receptors during the development and maintenance of caprine corpora lutea. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 2, p. 166–171, fev. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.10244>>. Acesso em: 30 maio. 2018.

KAYA, S. et al. Association of luteal blood flow with follicular size, serum estrogen and progesterone concentrations, and the inducibility of luteolysis by PGF₂α in dairy cows. **Theriogenology**, v. 87, p. 167–172, 2017.

KINDER, J. E. et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424, 1 jun. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/74/6/1424-1440/4624785>>. Acesso em: 29 ago. 2019.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. **Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review** **Theriogenology**, 1992. .

LUCHIARI FILHO, A. **Produção de carne bovina no brasil qualidade, quantidade ou ambas?** Disponível em: <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Produção-De-Carne-Bovina-No-Brasil/664025.html>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

LUCY, M. .; MCDUGALL, S.; NATION, D. . The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 495–512, 1 jul. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000934?via%3Dihub>>.

Acesso em: 25 jun. 2018.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3615–3626, 1992.

LÜTTGENAU, J. et al. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 12–22, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.025>>.

MACMILLAN, K. L. et al. Some effects of post-oestrous hormonal therapies on conception rates and resubmission rates in lactating dairy cows. **BSAP Occasional Publication**, v. 26, n. 1, p. 195–208, 27 fev. 2001. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0263967X00033681/type/journal_article>. Acesso em: 15 ago. 2019.

MAPLETOFT, R. J. et al. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. Suppl.2, p. 28–36, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237726479_The_use_of_controlled_internal_drug_release_devices_for_the_regulation_of_bovine_reproduction1>.

MARQUES, M. O. et al. Influence of category - heifers, primiparous and multiparous lactating cows - in a large-scale resynchronization FTAI program. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 367–371, 2015. Disponível em: <<http://pdf.medrang.co.kr/JVS2/ahead/JVS960.pdf>>.

MARTÍNEZ, M. F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1–2, p. 37–52, 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004001617?via%3Dihub>>.

MARTINEZ, M. F. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization

and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 00, p. 757–769, set. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X00003885>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 232–240, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.027>>.

MCDICKEN, W. N.; ANDERSON, T. The difference between Colour Doppler velocity imaging and Power Doppler Imaging. **European Journal of Echocardiography**, v. 3, n. 3, p. 240–244, 2002.

MCMILLAN, W. H.; MACMILLAN, K. L. CIDR-B for managed reproduction in beef cows and heifers. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 49, p. 85–89, 1989. Disponível em: <<http://www.nzsap.org/system/files/proceedings/1989/ab89017.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

MENEGAZ, A. L.; LOBATO, J. F. P.; PEREIRA, A. C. G. Influence of feeding management on weight gain and reproductive performance of beef heifers. / Influência do manejo alimentar no ganho de peso e no desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1844–1852, 2008. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lbh&AN=20093035670&lang=es&site=ehost-live%5Cnemail:jose.fernando.lobato@ufrgs.br>>.

MENEGHETTI, M. **MÊS DE PARIÇÃO, CONDIÇÃO CORPORAL E RESPOSTA A PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM VACAS DE CORTE PRIMÍPARAS**. 2006. 2006.

MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 329–339, 2005.

MIYAMOTO, A. et al. **A Potential Use of Color Ultrasound as a Tool for Reproductive Management: New Observations Using Color Ultrasound Scanning that were not Possible with Imaging Only in Black and White** **Journal of Reproduction and Development**. [s.l: s.n.].

MUNRO, R. K.; MOORE, N. W. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p.

353–359, 1985.

NETT, T. . et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 33–42, jul. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724002001431>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617764>>.

O'HARA, L. et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 2, p. 328–336, 2014.

OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. **OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-en>. Acesso em: 5 dez. 2019.

ONU, U. S. **World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables** Department of Economic and Social Affairs, Population Division. [s.l: s.n.].

PANCARI, S. M. et al. Use of Estradiol Cypionate in a Presynchronized Timed Artificial Insemination Program for Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 122–131, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74060-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74060-5)>.

PARR, M. H. et al. Establishment of critical timing of progesterone supplementation on corpus luteum and embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 180, p. 1–9, maio 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432017301318>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

PENTEADO, L. et al. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization 14 or 22 days after TAI. **Animal reproduction (Abstract)**, v. 13, p. 235, 2016.

PÖTTER, L.; LOBATO, J. F. P.; MIELITZ NETTO, C. G. A. Análises Econômicas de Modelos de Produção com Novilhas de Corte Primíparas aos Dois , Três e Quatro Anos de Idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 861–870, 2000.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Steroid Control of Gonadotropin Secretion and Ovarian Function in Heifers. **Endocrinology**, v. 122, n. 5, p. 2222–2231, 1 maio 1988. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-122-5-2222>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

PUGLIESI, G. et al. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 85–91, 2014a.

PUGLIESI, G. et al. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy?1. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 1–12, 2014b. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.121525>>.

PUGLIESI, G. et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. p. 140–150, 2017.

PUGLIESI, G. et al. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: Feasibility and field results. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 239–246, 2018.

PUGLIESI, G. et al. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed-inseminations within 22 days. **Reproduction in Domestic Animals**, n. May, p. rda.13475, 2019a. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.13475>>.

PUGLIESI, G. et al. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 73–79, 2019b.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

QUIRK, S. M.; FORTUNE, J. E. Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, n. 2, p. 609–621, 1986.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. REVIEW Angiogenesis in the Corpus Luteum. v. 12, n. 1, p. 1–9, 2000.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265–277, 1995.

ROBINSON, R. S. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965–979, 2001.

SÁ FILHO, M. F. et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 284–290, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.027>>.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, ago. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X12001422>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 113, n. 1–4, p. 287–292, 2009.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Lengthening the Bovine Estrous Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone: A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance*. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 916–925, ago. 1990. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-127-2-916>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

SPENCER, T. E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 537–550, 1 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000703?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 nov. 2017.

STEVENSON, J. S. et al. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen , progesterone , or both. **J. Anim. Sci**, v. 81, n. 7, p. 1681–1692, 1 jul. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/81/7/1681/4789919>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Dominance in Cattle : Relationship between Prolonged Growth of the Ovulatory Parameters *. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108–1114, 1993.

TARSO, S. G. S. de et al. Novel prospects for evaluation of follicle wall blood flow using color-Doppler ultrasonography. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 762–771, 2016.

Disponível em:
<[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n4/p762-771\(AR806\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n4/p762-771(AR806).pdf)>.

THATCHER, W. W. et al. Effect of Estradiol-176 on Peripheral Plasma. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745–756, 1986.

THATCHER, W. W. et al. Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. suppl_3, p. 16–30, 1 jan. 1994. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/72/suppl_3/16-30/4632528>. Acesso em: 12 nov. 2019.

USDA, U. S. D. of A. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. [s.l.: s.n.].

USDA, U. S. D. of A. Livestock and poultry: world markets and trade. **United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service**, n. October, p. 22, 2019. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF>.

VAN CLEEFF, J. et al. Effects of administering progesterone at selected intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1117–1130, 1 nov. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X96002841?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 ago. 2019.

VARUGHESE, E. E. et al. Correlation of blood flow of the preovulatory follicle to its diameter and endocrine profile in dairy buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 140–144, 2014.

VIANA, J. H. M. et al. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal reproduction**, v. 10, n. 3, p. 215–222, 2013.

WILTBANK, M. C. et al. **Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows** *Theriogenology* Elsevier Inc., , 1 jul. 2016. .

WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042–1055, 2004.

YAN, L. et al. Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1390- 1398.e1, maio 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15007025>>. Acesso em: 27 jun.

2019.