



Mitos e verdades em protocolos de IATF

Myths and truths on timed artificial insemination in cattle

José R. de S. Torres-Júnior^{1,4}, Diego Luiz dos S. Ribeiro², Hélyda Gomes Pereira³,
Itamara Gomes de França³

¹Prof. Associado DMV/CCAA/UFMA, Chapadinha, MA, Brasil.

²Méd. Veterinário, Mestre em Ciência Animal, CCA/UEMA, São Luís, MA, Brasil.

³Zootecnista, Mestre em Ciência Animal, CCA/UFMA, São Luís, MA, Brasil.

⁴Correspondência: jrtorresjr@gmail.com

Resumo

As biotecnologias aplicadas à reprodução assistida em bovinos têm sido exaustivamente estudadas por inúmeros grupos de pesquisa no Brasil e no mundo. O principal destaque são os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que participaram ativamente na evolução do uso da IA na última década. Neste cenário, muitas inovações têm sido propostas, tanto na administração de hormônios, quanto no manejo das fêmeas durante os protocolos. Considerando a importância deste tema, objetivamos neste manuscrito discutir sobre a efetividade e os resultados alcançados com a utilização de alguns desses protocolos propostos ao longo dos últimos anos.

Palavras-chave: bovinos, biotecnologia, reprodução, inseminação artificial em tempo fixo.

Abstract

Biotechnologies applied to assisted reproduction in cattle have been exhaustively studied by many research groups in Brazil and around the world. The timed artificial insemination (TAI) protocols have an active participation in the AI programs in the last decade. In this way, many innovations have been proposed, both in the administration of hormones, and in the management of the females during these protocols. Considering the importance of this theme, this manuscript aims to discuss the effectiveness and recent results achieved with the use of some of these protocols proposed over the last years.

Keywords: bovine, biotechnology, reproduction, fixed-time artificial insemination.

Introdução

O setor pecuário brasileiro vem evoluindo progressivamente e tem se destacado por sua importante participação no PIB do País, com aumento 45,3% nos últimos dez anos (CEPEA, 2016). A bovinocultura tem sido reconhecida, porém exige máxima eficiência para que haja garantia de índices de desempenho positivos. Esta eficiência pode ser otimizada por meio da adoção de técnicas de manejo assistido aos rebanhos, dentre as quais estão a inseminação artificial (IA) e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Atualmente, os programas de IA tem sido parte integrante do manejo reprodutivo em muitos rebanhos e oferecido oportunidade de incorporar receita aos sistemas de cria. Estudos realizados por grupos de pesquisa do Brasil e do mundo possibilitaram o uso sistemático da IATF, que é o principal destaque e contribuiu massivamente na evolução de 47% no uso da IA entre os anos de 2009 e 2014 (ASBIA, 2016).

Todo este sucesso e perspectiva comercial geraram demanda por aperfeiçoamento dos protocolos, a fim de se obter índices de gestação cada vez maiores. A partir de então, a comunidade científica tem continuado a propor novos protocolos e técnicas que possibilitem maior sincronização, crescimento folicular e ovulação, além de melhorias na luteinização e consolidação da sobrevivência embrionária.

Nestes termos, objetivamos neste manuscrito discutir sobre efetividade e resultados alcançados com a utilização de alguns destes protocolos propostos ao longo dos últimos anos, bem como elucidar alguns mitos e verdades sobre a técnica de IATF em bovinos de corte.

Protocolos-padrão à base de progesterona, estradiol e prostaglandina

Neste manuscrito serão prioritariamente abordadas adaptações realizadas no protocolo à base de progesterona, estradiol e prostaglandina, para gado de corte, em virtude de sua ampla utilização e eficiência já reconhecida.

Este protocolo pode ser iniciado em dia aleatório do ciclo estral e visa: *i*) sincronizar a atresia da onda folicular presente no ovário, *ii*) induzir a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular, *iii*) controlar o crescimento final do folículo dominante e, finalmente, *iv*) induzir a ovulação sincronizada.

Normalmente o protocolo tem duração média de 9 a 11 dias e consiste na inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona/progestágeno, combinado com a administração intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol no dia zero (D0) (Martinez et al., 2000; Bó et al., 2002; Cavalieri et al., 2006). O dispositivo permanece por 7, 8 ou 9 dias (Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2004; Meneghetti et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009) e, no momento de sua remoção, é administrada uma dose prostaglandina F2 α para luteólise, com a opção de se administrar também gonadotrofina coriônica equina (eCG), objetivando suporte de LH para o crescimento final do folículo dominante, sobretudo em fêmeas no período pós-parto (Pessoa et al., 2016). Para indução da ovulação se tem utilizado o benzoato de estradiol administrado 24 horas após a remoção do dispositivo (quatro manejos) (Sales et al., 2012), o cipionato de estradiol administrado na remoção do dispositivo (protocolo três manejos) (Torres-Júnior et al. 2014) ou GnRH no momento da IATF (Sá Filho et al., 2010a).

Mitos e verdades em protocolos de IATF em gado de corte

Apesar de os protocolos de IATF já serem consolidados como uma ferramenta essencial para obtenção de um bezerro/vaca/ano, e de o protocolo-padrão já ser bem conhecido, muitas questões ainda não estão totalmente esclarecidas e precisam ser resolvidas. Geralmente as inovações propostas no protocolo à base de progesterona-estradiol-prostaglandina se dão no período após a remoção do dispositivo, quando ocorrerá a fase de crescimento exponencial final do folículo dominante (Colazo e Mapletoft, 2014). É justamente neste período que o folículo adquire a capacidade ovulatória, graças ao suporte endócrino, desde que as condições ambientais e de manejo sejam satisfatórias (Gimenes et al., 2008).

Algumas questões acerca do manejo de inseminação artificial também têm sido levantadas e serão também discutidas adiante, juntamente com tópicos sobre os protocolos hormonais, os quais nos ajudarão a desmistificar alguns mitos e reafirmar muitas verdades sobre a IATF.

Meia dose de Prostaglandina

A utilização de prostaglandina F2 α (PGF) ou de algum de seus análogos é essencial ao sucesso dos protocolos de IATF (Colazo e Mapletoft, 2014), uma vez que a luteólise é essencial para que o folículo dominante se desenvolva até a fase pré-ovulatória e alcance a ovulação (Kastelic et al., 1990). Porém, muitos destes análogos se encontram disponíveis no mercado (Dudhatra et al., 2012) e variados são os protocolos nos quais são usados (Cipriano et al., 2011). Ademais, cada um dos análogos apresenta particularidades farmacocinéticas (Tang et al., 2007).

Além disso, já é sabido que a PGF é incapaz de induzir a luteólise quando administrada poucos dias após a ovulação. A razão para isto é que o corpo lúteo se encontra refratário à prostaglandina por cinco a sete dias após a ovulação (metaestro), por expressar diferencialmente peptídeos vasoativos (Levy et al., 2000; Miyamoto e Shirasuna, 2009; Wenzinger e Bleul, 2012) ou devido a especificidades na transdução de sinal mediada por expressão gênica de receptores de prostaglandina neste período (Goravanahally et al., 2009).

Em trabalhos realizados com vacas Nelore (*Bos indicus*), a incidência de luteólise induzida por dinoprost trometamina foi maior ($P < 0,05$) no dia 7 quando comparado ao dia 5 do ciclo estral (75,9 % e 40,5 %, respectivamente). A incidência de luteólise aumentou de acordo com dose administrada, sendo de 41,6 % para meia dose (12,5mg), de 56,6% para dose recomendada (25mg) e de 75,2 % dose dupla (50mg) de Lutalyse[®] ($P < 0,05$) (Ferraz Júnior, 2012).

Em outro estudo publicado recentemente, o ponto considerado de extrema importância, foi a evidência de que a meia dose de dinoprost trometamina (12,5mg) ocasionou luteólise parcial em 49,1% das fêmeas (Ferraz Júnior et al., 2016), servindo, segundo os autores, como um alerta ao uso de meia dose de PGF2 α em protocolos de IATF, principalmente nos lotes de vacas cíclicas.

Estudos usando programas de sincronização com o protocolo *Ovsynch* (GnRH-PGF-GnRH) relataram que vacas leiteiras com CL funcional que não baixaram as concentrações de progesterona (P4) para níveis basais tiveram pouca ou nenhuma chance de concepção após uma inseminação em tempo fixo e, que vacas tratadas com doses maiores ou doses adicionais 24 horas após a primeira tiveram maior fertilidade (Martins et al., 2011; Giordano et al., 2013). Portanto, é essencial que vacas com CL funcional tenham regressão luteínica completa após a aplicação da PGF2 α do protocolo *Ovsynch*, a qual é caracterizada pela queda da P4 circulante a níveis basais antes da inseminação em tempo fixo (Martins et al., 2011; Martins e Pursley, 2016).

Outro análogo de PGF, o D-cloprostenol também foi testado, na dose recomendada (150 μ g) ou dupla (300 μ g) em diferentes momentos pós-ovulação em vacas leiteiras. Os autores concluíram que o percentual de regressão luteal aumenta proporcionalmente à dose, sobretudo após o quinto dia após a ovulação (dose simples: 60% vs. dose dupla: 80%; $P < 0,05$) Valldecabres-Torres et al. (2012). Fernandes e Figueiredo (2007) também mostraram que doses reduzidas de D-cloprostenol foram menos eficientes em vacas leiteiras.

Meira et al. (2006), trabalhando com vacas Nelore cíclicas em diestro (8 dias após a detecção do estro e com CL identificado por ultrassonografia), observaram que meia dose (7,5mg) de PGF2 α siática (Luprostin[®])

administrada tanto pela via intramuscular [69,6% (16/23)] quanto pela via submucosa intra-vulvar [76,0% (19/25)] causaram luteólise completa, ambas de modo similar ao grupo que recebeu a dose recomendada (15mg) por via intramuscular [86,9% (20/23)]. Em outro estudo, realizado com fêmeas *Bos taurus* de corte, a ocorrência de luteólise com dose reduzida de dinoprost (5mg) foi observada em 50% das fêmeas tratadas no dia 10 do ciclo e em nenhuma nas tratadas no dia 5, independentemente da via de administração (intramuscular ou submucosa intra-vulvar) (Rovani et al., 2012). Nesta mesma pesquisa, a luteólise ocorreu em 100% das fêmeas que receberam a dose recomendada, independentemente do dia (5 ou 10), mostrando mais uma vez que a eficiência é dose-dependente.

Por outro lado, Meneghetti et al. (2009) administraram 12,5 mg (meia dose) ou 25 mg (dose recomendada) de dinoprost trometamina em vacas nelore cíclicas 48 horas antes da remoção do dispositivo de P4 (remoção no D9) e verificaram taxas de ovulação e de concepção similares. Estes autores restringiram suas conclusões sobre a eficiência da meia dose somente a vacas Nelore com corpo lúteo de mais de sete dias, neste protocolo.

Com esta perspectiva, uma série de outros estudos, principalmente no Brasil, já utilizam como protocolo-padrão a utilização de meia dose dinoprost trometamina (12,5mg; Hiers et al., 2003; Claro-Júnior et al., 2016, Blaschi et al., 2016, Carvalho et al., 2016) e ou de cloprostenol sódico (250µg; Marques et al., 2015; Ferreira et al., 2016, Motta et al., 2016; Teixeira et al., 2016) em protocolos à base de estradiol-progesterona-prostaglandina em fêmeas zebuínas de corte, com taxas de prenhez consideradas satisfatórias pelos autores, embora nestes delineamentos não tenham sido comparadas diferentes doses de PGF, tampouco avaliada a luteólise estrutural (redução do CL) ou funcional (redução da P4).

Contextualizando as pesquisas acima citadas, há muitos fatores que podem influenciar na incidência de luteólise total ou parcial em fêmeas bovinas, devendo estes, ser adequadamente considerados ao se elaborar protocolos de IATF, além da farmacocinética distinta já comprovada entre diferentes análogos. Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência da administração genérica de doses reduzidas de Prostaglandina (PGF) no protocolo de rotina de campo ainda não está consolidada e permanece controversa.

Contudo, sabe-se que no Brasil os alvos principais dos protocolos de IATF à base de progesterona-estradiol são, em sua maioria, as fêmeas zebuínas no pós-parto, cujo percentual de anestro é elevado (Baruselli et al., 2004). Sabe-se também que, nas fêmeas cíclicas tratadas com este mesmo protocolo, os CLs tendem a ter mais de sete dias no momento da aplicação de prostaglandina. Especificamente neste cenário, se pode admitir que a administração de doses reduzidas de PGF pode ser uma opção, a qual deve ser melhor estudada.

Redução da dose de eCG na remoção do dispositivo de P4

A necessidade de obter reconcepção o mais rápido possível após o parto mobilizou muitos estudos, sobretudo em fêmeas *Bos indicus*, as quais apresentam o anestro pós-parto mais acentuado devido à insuficiente liberação pulsátil de LH para suportar o estágio final de desenvolvimento folicular e a ovulação (Baruselli et al., 2004, Yavas e Walton, 2000a; b).

Diante desta expectativa já antiga, se tem buscado adaptar protocolos que possam sincronizar eficientemente a ovulação em fêmeas em anestro. Desde meados dos anos 70, aparentemente vinha surgindo uma alternativa para aumentar as taxas de prenhez em protocolos à base de progesterona-estradiol, a então conhecida PMSG (gonadotrofina sérica da égua prenhe), que naquela ocasião foi eficientemente usada em fêmeas acíclicas das raças Hereford e Angus (*Bos taurus*) (Mulvehill e Sreenan, 1977). Os estudos evoluíram e se chegou então a uma série de evidências científicas de que a PMSG, nossa atualmente conhecida eCG (gonadotrofina coriônica equina) poderia, de fato, estimular o crescimento folicular, a ovulação e a luteinização mediados pelo aumento na disponibilidade de LH (Cavaliere et al., 1997; Bo et al., 2003, Murphy, 2012), resultando em taxas de gestação aceitáveis após IATF, tanto em vacas (Sales et al., 2016) quanto em novilhas (Sá Filho et al., 2010b) tratadas com 400 UI na remoção do dispositivo de P4.

Contudo, em virtude da necessidade de melhorar o custo-benefício da IATF, alguns autores têm avaliado a utilização de doses reduzidas de eCG no protocolo, cuja eficácia depende diretamente de fatores tais como agrupamento genético, escore de condição corporal e taxa de ciclicidade (Mello et al., 2014).

Recentemente foi realizado um grande estudo retrospectivo no qual se comparou diferentes doses de eCG [Controle sem eCG: n = 2239 vs. eCG300UI: n = 1689 vs. eCG400UI: n = 1662] em vacas taurinas de corte (Trentin et al., 2016). Segundo os autores, a ocorrência de estro foi maior no grupos tratados com 300UI ou 400UI (73,8% e 76,4% respectivamente) do que no Controle (48,8%) (P < 0,0001). A taxa de concepção geral também foi inferior no controle (36,8%) quando comparado a 300UI (51,4%) ou 400UI (59,3%), que foram similares entre si (Trentin et al., 2016). A ressalva mais importante feita pelos autores diz respeito às primíparas, as quais empreharam proporcionalmente mais na dose de 400UI (60,0%), seguida pelo tratamento com 300UI (46,4%) e Controle (35%) (P < 0,0001). Na categoria das multiparas os tratamentos com 300 ou 400UI foram similares (Trentin et al., 2016).

Pessoa et al. (2016) testaram as mesmas doses de eCG em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes



(Controle sem eCG: n = 323 vs. eCG300UI: n = 326 vs. eCG400UI: n = 317) e observaram que a ocorrência de estro [Controle (53,7%) vs. 300 UI (70,6%) vs. 400 UI (77,0%) e a taxa de concepção [Controle (29,7%) vs. 300UI (44,8%) vs. 400UI (47,6%)] foram melhoradas pelo tratamento com eCG ($P < 0,0005$). Os autores concluíram que ambas as doses (300 ou 400UI) foram igualmente eficientes em aumentar as taxas de prenhez, resultados estes, similares aos encontrados por Sá Filho et al. (2009a).

Giroto et al. (2016) usando dispositivo intravaginal monodose de P4 em novilhas Nelore cíclicas observou efeito aditivo do eCG na taxa de concepção, sem diferenças entre 200UI (45,8%; 132/288) ou 300UI (40,8%; 122/299) ($P > 0,05$). Em outro, estudo foi testada a dose de 200UI na primeira IATF pós-parto em vacas Nelore em anestro, no qual não houve diferença entre os animais tratados com 200UI [42,1% (16/38)] ou 300UI [44,0% (22/50)] de eCG (Rocha et al., 2007). Contudo, devido ao baixo n amostral desta última pesquisa e à ausência de mais estudos, acreditamos que ainda não se tem conclusões suficientes sobre a eficiência de doses menores do que 300 UI de eCG na primeira IATF em vacas no pós-parto, sobretudo em anestro.

Somente em protocolos de resincronização foram publicadas pesquisas mais consistentes sobre o uso de 200UI de eCG em vacas zebuínas de corte lactantes. Isto devido à eCG ter propriedades imunogênicas, com produção de anticorpos anti-eCG sobretudo nos primeiros 18-25 dias após a aplicação (Drion et al., 2001; Mantovani, 2010). Em um experimento com 150 vacas Nelore lactantes por tratamento (67% de ciclicidade, ou seja, presença de CL no início do protocolo), Doroteu et al. (2015) concluíram que não houve diferença significativa na ocorrência de prenhez nos animais que receberam a dose de 200UI ou 300UI na resincronização. Já em outra pesquisa, Campos et al. (2013) obtiveram taxa de prenhez de 52,7% (39/74) na resincronização com 300UI e de apenas 25,7% (18/70) com 200UI ($P < 0,05$).

Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência da eCG na dose de 300UI como protocolo de rotina de campo pode ser considerada VERDADE, enquanto que o uso de 200UI ainda necessita de estudos adicionais que venham a comprovar a sua eficiência, principalmente nas fêmeas com baixo escore de condição corporal e/ou em anestro pós-parto, que são as categorias que mais necessitam de eCG.

PERSPECTIVAS: há os novos indícios de que a utilização de 400UI de eCG na remoção do dispositivo pode aumentar a fertilidade de primíparas com baixo escore de condição corporal, os quais devem ser melhor estudados.

Utilização de FSH na remoção do dispositivo

Após se consolidar o uso da eCG no momento da retirada do dispositivo de P4, para potencializar o crescimento folicular final e ovulação (Bó e Baruselli, 2014), outra alternativa que vem sendo amplamente empregada é o uso de FSH, porém com resultados ainda controversos (Santos et al., 2007; Lima et al., 2010; Sales et al., 2011).

Alguns estudos comprovam a presença de receptores para FSH em folículos dominantes (>10mm) (Ferreira et al., 2002, Hampton et al., 2004), contudo, após a fase de desvio, os folículos são comprovadamente mais dependentes de LH (Ginther et al., 1996; Mihm et al., 2006).

Santos et al. (2007) observaram que fêmeas Nelore tratadas com 10mg (59,7%) ou 20mg (58,5%) de pFSH tiveram taxa de concepção à IATF similares à eCG (60,2%), o mesmo também encontrado por Martins et al. (2010) e Nogueira et al. (2014). De modo contrastante, em uma série de outros estudos, a suplementação com FSH na retirada do dispositivo de progesterona não promoveu resultados semelhantes à eCG no crescimento folicular e na taxa de prenhez [FSH: 45,1% (130/288) vs eCG: 53,8% (175/325); $P < 0,05$] em vacas Nelore submetidas à protocolos de IATF a base de progesterona-estradiol (Bottino, 2014). Estes autores evidenciaram estas diferenças principalmente nas primíparas [FSH: 7,7% (3/39) vs. eCG: 41,7% (30/72); $P < 0,01$]. Estas mesmas diferenças foram também encontradas por Sales et al. (2011) em fêmeas com baixo escore de condição corporal [FSH: 25,5% (12/47) vs. eCG: 66,7% (34/51); $P < 0,01$]. Lima et al. (2010) e Meneghetti et al. (2009) também não observaram efeito comparável do FSH em relação à eCG, no momento da retirada do dispositivo de Progesterona.

Segundo Sales et al. (2011), tal diferença em relação ao FSH, pode ser devido à capacidade da eCG em se ligar tanto a receptores de FSH, quanto de LH (Murphy, 2012), à sua maior meia vida plasmática (Martinuk et al., 1991), promovendo ação prolongada, além do estímulo à luteinização e maior expressão de genes que viabilizam substrato energético ao corpo lúteo subsequente (Sousa et al., 2016).

Após uma ampla revisão, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência do FSH no momento da retirada do dispositivo de P4 como protocolo de rotina de campo ainda não está consolidada e permanece controversa.

Indução da ovulação com GnRH

Protocolos nos quais se utiliza o GnRH para indução de ovulação têm sido largamente utilizados, e com sucesso, principalmente em plantéis leiteiros *Bos taurus* (Wiltbank et al., 2011). Contudo, quando administrados



em fêmeas zebuínas de corte, os resultados têm sido inconsistentes, tanto no protocolo *Ovsynch* (Bó et al., 2003) quanto ao final do protocolo padrão à base de progesterona-estradiol-prostaglandina, para IATF com sêmen convencional (Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al. 2009b; Sá Filho et al., 2011) ou sexado (Silva, 2012). Estes protocolos apresentam eficiência limitada quando aplicados em vacas zebuínas lactantes sob condições extensivas de manejo em climas tropicais que, frequentemente, estão associadas a alta ocorrência de anestro pós-parto (Baruselli et al., 2012).

Adicionalmente, quando o GnRH foi administrado no momento da IATF em protocolos à base de Norgestomet associado ao valerato de estradiol no dia zero (D0; protocolo Crestar[®]), houve melhora significativa na taxa de prenhez em vacas Nelore no pós-parto (GnRH: 48,0% vs. Controle: 37,6%; P = 0,02) (Sá Filho et al., 2010a). Por outro lado, quando se utilizam os dispositivos intravaginais de P4 associados a estradiol no dia da remoção do dispositivo, estudos de campo comprovam que, de maneira geral, realmente a administração de GnRH como indutor de ovulação único (Sá Filho et al., 2011) ou complementar aos estradióis (Silva, 2012) parece não ser eficiente em fêmeas *Bos indicus* de corte.

Esta suposta ineficiência pode ser ainda maior, caso o pico de GnRH induza ovulação antes mesmo do *clearance* endógeno de estradiol produzido pelo folículo dominante (Souza et al., 2007). Apesar de Pinheiro et al. (2013) terem concluído que o GnRH exógeno administrado 2 a 4 semanas pós-parto em fêmeas Nelore foi suficiente para induzir pico endógeno de LH, também foi evidenciado que o estradiol pré-ovulatório é necessário sob alguns aspectos importantes para o estabelecimento da gestação, tais como transporte de gametas, ambiente uterino para a fertilização e desenvolvimento embrionário (Hawk e Cooper, 1975; Ryan et al., 1993; Sartori et al., 2002).

Em protocolo com cipionato de estradiol na retirada do dispositivo, não houve efeito do tratamento adicional com GnRH à IATF na taxa de ovulação [CE: 92,3% (12/13) vs. CE+GnRH: 100,0% (13/13); P = 0,61] nem na concepção [CE: 45,2% (52/115) vs. CE+GnRH: 39,1% (45/115); P = 0,09] de vacas nelore inseminadas com sêmen sexado, sem identificação de estro (Silva, 2012)

Em vacas leiteiras, Segundo Souza et al. (2007), a suplementação com estradiol ao protocolo *Ovsynch* resultou em maior fertilidade e maior sincronização da ovulação, sobretudo naquelas com baixo escore de condição corporal e/ou primíparas. Nos grupos que receberam apenas GnRH, a ocorrência de estro e a chance de concepção à IATF foram menores.

Do mesmo modo, ao se trabalhar com fêmeas Nelore no pós-parto, a maior proporção de estros foi observada nos grupos tratados com cipionato de estradiol (CE) na retirada do dispositivo de P4 [CE:78,7% (140/178) e CE+GnRH: 72,7% (125/172)] quando comparados ao tratado somente com GnRH à IATF [43,2% (82/190)] (Sá Filho et al., 2011). A taxa de prenhez à IATF também foi maior nas vacas tratadas com CE [56,2% (100/178)] e CE+GnRH [52,9% (91/172)] do que nas tratadas somente com GnRH [39,0% (74/190)] (P = 0,002) (Sá Filho et al., 2011).

Sob as perspectivas atuais de que o estro é importante para garantir altas taxas de prenhez à IATF e que os protocolos com estradiol são os mais adequados para fêmeas *Bos indicus* no pós-parto, Nogueira et al. (2016) e Sá Filho et al. (2016) (dados não publicados) conduziram experimentos nos quais se adicionou GnRH no momento da IATF em vacas que receberam cipionato de estradiol na remoção do dispositivo. Nas fêmeas que não apresentaram estro, os resultados demonstraram efeito positivo da aplicação de GnRH no momento da IATF [Controle: 36,0% (n = 369) vs GnRH 50,3% (n = 415); P < 0,001] (Nogueira et al., 2016).

Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência do GnRH como indutor de ovulação no protocolo de rotina de campo ainda não está consolidada e permanece controversa.

PERSPECTIVAS: há novos indícios de que a administração complementar de GnRH no momento da IATF pode aumentar a fertilidade de vacas que não expressam o estro em protocolos à base de estradiol-progesterona-estradiol, os quais devem ser melhor estudados.

Suplementação com progesterona após a IATF

Por décadas, têm sido estudados os efeitos da suplementação com progesterona (P4) ao início do diestro subsequente à inseminação na taxa concepção em bovinos. Entretanto este assunto voltou à tona com o advento da IATF em larga escala.

Recentemente Pugliesi et al., (2016a) testaram a suplementação com de 150 mg de P4 injetável de longa ação (via intramuscular) 4 dias após a IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) e verificaram que não houve diferenças na taxa de prenhez entre as vacas tratadas com P4 (53,2%; 209/393) ou placebo (56,2%; 219/390), e que somente nas fêmeas com CL < 0,9 cm a P4 mostrou efeito positivo [57.9% (22/38) vs. 40.4% (21/52); P < 0,05]. Quando os mesmos autores compararam a taxa de prenhez somente nas fêmeas em anestro, que ovularam, também não houve diferença significativa da suplementação com P4 [59%; (105/178) vs. 49,7%; (86/173); P = 0,08].

Já em um trabalho de campo realizado no Brasil, também com fêmeas Nelore, entre 30 e 60 dias pós-parto, com ciclicidade desconhecida, foi encontrada maior P/IATF para o grupo suplementado com P4 em



relação ao grupo Controle [57,8% (111/192) vs. 45,6% (105/230); $P = 0,01$].

Porém, os efeitos da suplementação com P4 sobre a funcionalidade do CL ainda são pouco claros, visto que pode causar antecipação da luteólise em fêmeas não inseminadas (Pugliesi et al., 2015), ou não ter efeito, no caso de fêmeas inseminadas [Controle: 31,8%^b (7/22) vs. P4: 61,9%^a (13/21) vs. IA+P4: 34,8%^{ab} (8/23); ^{a,b} $P = 0,05$] (Martins et al., 2016).

Oportunamente, Yan et al. (2016) realizaram uma meta-análise envolvendo 84 tratamentos reportados em 53 estudos nos quais se comparou vacas suplementadas ($n = 9135$) ou não ($n = 9905$) com P4 após a IA. Os autores observaram que não houve efeito significativo quando a P4 foi administrada após a sincronização de estro, ou em vacas com fertilidade normal.

A conclusão geral é que a suplementação com P4 pode atenuar os efeitos negativos de fêmeas com folículos ovulatórios pequenos ou função luteal comprometida, e que seus efeitos benéficos estão restritos a condições específicas tais como animais de baixa resposta ao protocolo, baixa fertilidade ou com estro natural.

Segundo Pugliesi et al. (2016) ainda se faz necessário explorar e elucidar as inconsistências nos estudos sobre fertilidade em fêmeas suplementadas com P4, para que se promovam avanços em seu uso nos protocolos de IATF.

Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência da suplementação com progesterona após a IATF como protocolo de rotina de campo ainda não está consolidada e permanece controversa.

PERSPECTIVAS: há indícios de que a suplementação com progesterona no diestro subsequente à IATF pode aumentar a fertilidade de fêmeas com baixa chance de concepção ou com progesterona deficitária, os quais devem ser melhor estudados.

Identificação de cio e ultrassonografia no protocolo de IATF

Dentre os vários fatores que influenciam nos resultados da IATF, o maior diâmetro folicular e a ocorrência do estro (cio) entre a remoção do dispositivo e a inseminação têm resultado em maiores chances de prenhez (Sá Filho et al., 2010c; Torres-Júnior et al., 2011). Segundo os autores, vacas que apresentam estro têm 3,3 vezes mais chance de se tornarem gestantes do que as que não apresentam estro.

No Brasil, os ésteres de estradiol têm sido utilizados com sucesso na indução de ovulação em fêmeas Nelore submetidas ao protocolo padrão à base de estradiol-progesterona (Torres-Júnior et al., 2014), com grande destaque para o cipionato de estradiol (CE), que permite redução no número de manejos (de 4 para 3) sem comprometer a fertilidade.

Sá Filho et al. (2011) observaram que a administração de CE na remoção do dispositivo de P4 aumentou significativamente ($P < 0,0001$) a proporção de fêmeas que apresentaram estro [78,7% (140/178)] quando comparadas àquelas que receberam apenas GnRH no momento da IATF [43,2% (82/190)]. Neste mesmo estudo, vacas que apresentaram estro tiveram maior diâmetro do folículo dominante, maior taxa de ovulação, maior CL e maior concentração de P4 no diestro subsequente à inseminação. Além disso, a taxa de concepção à IATF foi maior ($P < 0,0001$) nas vacas que apresentaram estro (61,9%) do que nas que não apresentaram (41,4%) (Sá Filho et al., 2011).

Sabe-se que, em condições fisiológicas, a ovulação ocorre aproximadamente 28 horas após o início do estro (Walker et al., 1996). Por outro lado, nas fêmeas que não manifestam estro no protocolo de IATF, a ovulação pode atrasar por até 28 horas em fêmeas *Bos taurus* (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999) e por 8-12 horas em *Bos indicus* (Estro = $72,0 \pm 12,0$ h vs. Sem Estro = $80,0 \pm 9,9$ h após remoção do dispositivo de P4; $P > 0,05$) (Lopes et al., 2012).

Diante desta perspectiva, Scheeren et al. (2015) realizaram um trabalho com fêmeas *Bos taurus* de corte no Brasil e não observaram diferença significativa ($P = 0,31$) na taxa de concepção entre novilhas que apresentaram estro [IATF48horas = 49,5% (154/311)] e as que não apresentaram estro [IATF48horas = 40,2% (35/87)], e foram inseminadas 12 horas mais tarde do que o recomendado no protocolo convencional [IATF60horas = 49,4% (39/79)]. Estes autores evidenciaram a necessidade de mais estudos, porém apontaram para uma nova perspectiva de eficiência ao administrar GnRH e atrasar a IATF em fêmeas que não manifestarem cio até 48 horas após a remoção do dispositivo de P4.

Também não houve benefício em atrasar a IATF em novilhas Angus (*Bos taurus*) tratadas com progestágeno oral sem manifestação de estro, em comparação às que manifestaram estro (Nielson et al., 2016). Do mesmo modo, Thomas et al. (2014), também não observaram efeito no atraso da IATF em novilhas taurinas de corte ($P = 0,76$). Entretanto, em vacas maduras no pós-parto esta estratégia surtir efeito positivo na taxa de prenhez.

De modo contrastante, em outro trabalho realizado na Argentina, o atraso de 12 horas na inseminação artificial em fêmeas taurinas de corte que não manifestaram estro possibilitou taxas de prenhez similares ($P > 0,05$) às que manifestaram estro, tanto em novilhas (62,5 vs. 62,7%, respectivamente), quanto em vacas solteiras (58,1 vs. 65,5%) ou paridas (39,0 vs. 55,0%) (Zabala et al., 2013a; b; c).

Em uma grande pesquisa realizada recentemente com 1611 vacas de corte em 15 fazendas distribuídas



em nove estados Americanos, Hill et al. (2016) identificaram estro após protocolo de IATF com GnRH no momento da inseminação e observaram que o atraso de 15 horas (75 horas após a remoção do dispositivo de P4) na inseminação aumentou significativamente a taxa de concepção em relação às inseminadas em horário convencional (60 horas após a remoção do dispositivo de P4) [GnRH60h + IATF75h (64,2%) vs. GnRH60h+IATF60h (39,2%)].

Ainda, diante da impossibilidade de monitorar a manifestação de estro com bastões marcadores, devido às intensas chuvas durante a estação de monta, Torres-Júnior et al. (2011) realizaram um trabalho de natureza prática e concluíram que o uso da ultrassonografia para a identificação de fêmeas com maior folículo dominante no momento da IATF (alta chance de prenhez) melhoraram a viabilidade econômica da IATF, principalmente pela possibilidade de direcionar para vacas mais férteis o sêmen de touros melhoradores (sêmen de maior custo), propiciando maior número bezerros de alto mérito genético e maior valor agregado.

Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, se pode afirmar que a maior chance de prenhez em fêmeas que manifestam cio antes da IATF é VERDADE. Adicionalmente, a alta correlação entre diâmetro folicular, ocorrência de cio e ovulação, conduz a afirmar que o aumento da eficiência quando se realiza a ultrassonografia no momento da IATF é VERDADE.

Finalmente, a recomendação irrestrita de atrasar a IATF em fêmeas *Bos indicus* com folículos menores, ou naquelas que não manifestaram estro, ainda não está cientificamente consolidada e, portanto, deve ser tratada com parcimônia, pois implica em significativo aumento no manejo. Ademais, evidências práticas adquiridas com a experiência profissional indicam que a divisão em sublotes de inseminação, principalmente em grandes plantéis de gado de corte pode conduzir a insucessos operacionais, tais como: i) sobreposição de manejos em lotes cujo número de fêmeas a inseminar é alto, ii) limitação no número de inseminações por dia, iii) prolongamento da estação de monta, iv) impossibilidade de manejar apartação e jejum em lotes de fêmeas com bezerro ao pé, v) exaustão da equipe de trabalho; etc.

Ressincronização sem detecção prévia de prenhez

Com a evolução da técnica de IATF ao longo dos últimos anos e a necessidade de suprir o mercado com animais de qualidade e precocidade para abate, naturalmente os acordos comerciais impulsionaram a demanda por mais produtos provenientes de inseminação artificial. Neste cenário, a ressincronização vem se destacando, pois tem sido relatada a possibilidade de se realizar nova IATF nas fêmeas não gestantes entre 22 e 30 dias após a primeira. (Sá Filho et al., 2014).

Em uma pesquisa recente, Marques et al. (2015) obtiveram taxa de prenhez geral por IATF de 81% (1985/2464) em fêmeas Nelore aos 40 dias de estação de monta, sendo 85% (770/903) nas novilhas, 76% (257/338) nas primíparas e 78% (958/1223) nas múltiparas ($P = 0,0001$). Neste trabalho, a concepção geral à primeira IATF foi de 55% (1367/2464) e a segunda IATF (ressincronização) foi realizada após diagnóstico gestacional ultrassonográfico (30 dias pós IATF) com taxa de concepção de 56% (618/1097).

Objetivando diminuir o intervalo entre a primeira e a segunda IATF e aumentar a eficiência reprodutiva, alguns estudiosos têm iniciado a ressincronização em todas as fêmeas, sem diagnóstico de gestação prévio, visto que a administração do agente luteolítico (PGF) se dá somente a partir do sétimo ou oitavo dia do protocolo à base de progesterona/progestágeno. Contudo, nestes protocolos, se faz o uso de benzoato de estradiol (BE; 2 mg) no dia da inserção do dispositivo (D0) e, segundo alguns pesquisadores, o estradiol administrado no diestro pode comprometer a função do CL e a continuidade da gestação (Munro e Moore, 1985; Cutáia et al., 2002; El-Zarkouny et al., 2002; Colazo et al., 2006).

Nesta perspectiva, Sá Filho et al. (2014) testaram a eficiência do BE (1 mg) no dia zero do protocolo de ressincronização em fêmeas Nelore, e concluíram que a administração de BE (1 mg) aos 22 dias após a primeira IATF provê taxa de concepção satisfatória (49,3%; $n = 140$) e não afeta o estabelecimento da gestação em fêmeas que emprenharam à primeira IATF. Rodrigues et al. (2016) também concluíram que programas de ressincronização com 22 (45,3%; $n = 157$) ou 30 (46,1%; $n = 157$) dias são alternativas viáveis para produzir mais bezerros por IA em estação de monta curta.

Pessoa et al. (2015) compararam as doses de 1 vs. 2 mg de BE ao início do protocolo de ressincronização aos 22 dias após a primeira IATF em vacas nelore no pós-parto e não houve diferenças no percentual de perdas embrionárias nas fêmeas gestantes da primeira IATF (3,8% vs 5,5% respectivamente). Neste mesmo trabalho, a taxa de concepção à segunda IATF foi maior nas fêmeas tratadas com 2 mg de BE (47,3%) do que com 1 mg (36,1%, $P < 0,01$). Porém, Bó et al. (2016) acreditam que há necessidade de maiores estudos no intuito de esclarecer melhor sobre o risco de perdas gestacionais associadas ao uso de doses maiores que 1 mg de BE no protocolo de ressincronização à base de progesterona-estradiol iniciado em fêmeas gestantes.

Outra alternativa para ressincronização mais precoce, revisada por Bó et al. (2016), foi reinserção de dispositivo de P4 + 1 mg de BE entre 12 e 14 dias após a primeira IATF, realizando diagnóstico gestacional por ultrassonografia Doppler após a remoção do dispositivo 7 ou 8 dias mais tarde (D19 a 22).

Vieira et al. (2014) relatou que a administração de 1,5 mg de EB 13 d após a primeira IATF afetou negativamente o CL (*ie.* reduziu a vascularização do CL avaliada por Doppler colorido) e a prenhez à primeira



IATF em vacas leiteiras. Já Penteado et al. (2016) obtiveram taxa de concepção de 51% e 56% para fêmeas ressinclonizadas aos 14 e 22 dias após a primeira IATF, respectivamente ($P>0,05$), sem contudo avaliar as perdas gestacionais associadas ao protocolo e a acurácia do exame ultrassonográfico Doppler do CL 22 dias após a primeira IATF.

Diante dos dados revisados, Bó et al. (2016) concluíram que programas de ressinclonização usando EB 12-14 dias após a primeira IATF ainda pode ser questionável, ou pelo menos arriscado.

Deste modo, de acordo com as evidências científicas apresentadas até o momento, a eficiência da ressinclonização sem detecção de prenhez iniciada 19-22 dias após a primeira IATF como protocolo de rotina de campo, acompanhada por exame ultrassonográfico de gestação na remoção do dispositivo, pode ser considerada VERDADE, e que o protocolo iniciado 12-14 dias após a primeira IATF ainda necessita de maiores estudos para ser consolidado.

Considerações Finais

Há inúmeras possibilidades de escolha na hora de se definir qual melhor protocolo de IATF a ser usado no rebanho, uma vez que a raça, a categoria animal e o *status* reprodutivo/nutricional, implicam em diferenças fisiológicas significativas que devem ser adequadamente consideradas ao se tomar decisões. A correta identificação destas variáveis e o planejamento consciente do processo nos levam a indicar o “manejo reprodutivo de precisão” como a melhor escolha, pois este sistema leva em consideração o protocolo mais adequado para cada condição animal, ambiental ou operacional. Por fim, ressaltamos a importância do acompanhamento técnico qualificado, pois somente o profissional da área tem capacidade de orientar sobre os “mitos e verdades” deste complexo processo, e deliberar sobre o melhor protocolo a ser utilizado em cada situação.

Referências

- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** Informações Técnicas sobre inseminação artificial. Disponível em: <http://www.asbia.org.br>. Acesso em 06 de Março de 2008.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** Index ASBIA Mercado 2014. <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>. Acesso em 28 de outubro de 2016.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p. 479-486, 2004.
- Baruselli PS, Sales JNS, Sala RV, VIEIRA LM, Sá Filho MF.** History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod*, v.9, p.139-152, 2012.
- Blaschi W, Laurini CR, Pegorari Júnior LAR, Arevalo Junior JC, Vianna FP, Almeida ARG, Monteiro LFG, Gaitkoski D, Barreiros TRR.** Eficiência da ressinclonização da ovulação com uma ou duas aplicações de acetato de leirelina em vacas nelore submetidas à TETF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.* p.219.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ.** The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.
- Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF.** Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.307-326, 2003.
- Bó GA, Baruselli PS.** Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal (Cambridge. Print)*, v.8, p.17, 2014.
- Bó GA, De La Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A.** Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86, p.388-96, 2016.
- Bottino MP.** Adição de gonadotrofinas em protocolos de IATF e fertilidade de vacas *Bos indicus*. 2014. 55p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- Carvalho ER, Rodrigues ADP, Claro Junior I, Vasconcelos JLM.** Comparação entre DIB monodose e CIDR na taxa de prenhez de novilhas nelore precoce submetidas à IATF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.231, 2016.* Resumo.
- Claro Junior I, Valino LS, Mantelo FM, Cutaia L, Wallace SP, Jose Vasconcelos LM.** Efeito de diferentes tipos de gonadotrofinas na taxa de prenhez de vacas nelore paridas submetidas à IATF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.204, 2016.* Resumo.
- Cavaliere J, Rubio I, Kinder JE, Entwistle KW, Fitzpatrick LA.** Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v.47, p.801-814, 1997.
- Cavaliere J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shephard RW, Macmillan KL.** Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, v.65, p.45-64, 2006.



- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA).** Relatório PIB agro-brasil. Junho de 2016. http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_junho16.pdf
- Cipriano RS, Carvalho BA, Marangoni NR, Nogueira GP.** LH and FSH concentration and follicular development in Nelore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci*, v.127, p.16-22, 2011.
- Colazo MG, Mapletoft RJ.** A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J*, v.55, n. 8, p.772-780, 2014.
- Colazo MG, Kastelic JP, Mainar-Jaime RC, Gavaga QA, Whittaker PR, Small JA, Martinez RE, Wilde DM, Veira RJ.** Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*, v.65, p.557-72, 2006.
- Cova MS, Lechinoski LC, Romero WSR, Freitas BG, Ramos RS, Antunes BA, Rezende MLG, Mingoti RD, Bastos MR.** Aumento da taxa de concepção com o uso de progesterona injetável de longa ação 4 dias após a IATF em vacas múltiparas e primíparas nelore paridas. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu*, p.227, 2016. Resumo.
- Cutaia L, Tribulo R, Tegli J, Moreno D, Bó GA.** The use of estradiol and progesterone inserts during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. *Theriogenology*, v.58, p.373, 2002.
- Doroteu EM, Oliveira RA, Pivato I.** Avaliação de diferentes doses de eCG na ressincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.16, p.449-457, 2015.
- Drion PV, De Roover R, Houtain JY, Mcnamara EM, Remy B, Sulon J, Beckers JF.** Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. v.41, p.207-215, 2001.
- Dudhatra GB, Mody SK, Patel HB, Modi CM, Chukewar AB, Avinash Kumar MM.** Prostaglandins and its analogues : An approach for treatment of anoestrus and to enhance breeding efficiency. *Vet World*, v.5, p.378-384, 2012.
- El-Zarkouny SZ, Stevenson JS.** Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. *J Dairy Sci*, v.87, p.3306-3321, 2004.
- Fernandes CAC, Figueiredo ACS.** Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.406-414, 2007.
- Ferreira JL, Tonioli R, Duarte ABG, Campagnari F, Boscaro AP, Pazini FS, Garcia JF.** Relative expression of insulin like growth factor I (IGFI) and follicle stimulating hormone receptor (FSHR) in follicles and ovarian tissue from *Bos primigenius indicus* (Nelore). *Braz J Vet Res Anim Sci; São Paulo*, v.39, p.208-212, 2002.
- Ferreira JE, Silva OR, Couto SRB, Silenciato LN, Mello MRB.** Eficiência reprodutiva de vacas nelores submetidas à IATF e repasse com touros. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu*, p.189, 2016. Resumo.
- Ferraz Júnior MVC, Pires AV, Biehl MV, Nepomuceno DD, Susin I, Ferreira EM, Faleiro Neto JA, Gouvea VN, Cruppe LH, Day ML.** Efeito de doses de prostaglandina f2 α em vacas nelore no 5 $^{\circ}$ e 7 $^{\circ}$ dia do ciclo estral. *VI Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – VNP – FMVZ – USP*, 2012.
- Ferraz Junior MVC, Pires AV, Biehl MV, Santos MH, Polizel DM, Nepomuceno DD, Sartori R, Barreto Filho JB, Gonçalves JRS, Day ML.** Luteolysis in *Bos indicus* cows on days 5 and 7 of estrous cycle with varying doses of prostaglandin F2 α . *Theriogenology*, v.86, p.1268-1274, 2016.
- Gimenes LU, Sa´ Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Júnior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852-858, 2008.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM.** Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, BAS S, Pawlisch R, Guenther JN, Nascimento AB.** Effect of increasing GnRH and PGF2 α dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.80, p.773-783, 2013.
- Girotto RW, Conti TL, Schneider AA, Leite Neto JLB, Gonçalves RL, Santos GP, Persico JMR, Sales JNS, Baruselli PS, Ferreira RM.** Efeito do uso de PGF2 α no D0 e diferentes doses de eCG no D8 de protocolos de IATF com dispositivo cronipres® mono dose 1g sobre a taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu*, p.199, 2016. Resumo.
- Goravanahally MP, Salem M, Yao J, Inskeep EK, Flores JA.** Differential Gene Expression in the Bovine Corpus Luteum During Transition from Early Phase to Midphase and Its Potential Role in Acquisition of Luteolytic Sensitivity to Prostaglandin F2 Alpha. *Biol Reprod*, v.80, p.980-988, 2009.
- Hampton JH, Bader JF, Lamberson WR, Smith MF, Youngquist RS, Garverick HA.** Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction*, v.127, p.695-703, 2004.
- Hawk HW, Cooper BS.** Improvement of sperm transport by the administration of estradiol to estrous ewes. *J*



Anim Sci, v.41, p.1400-1406, 1975.

Hiers EA, Barthle CR, Dahms MKV, Portillo GE, Bridges GA, Rae DO, Thatcher WW, Yelich JV. Synchronization of *Bos indicus* *Bos taurus* cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2 α in combination with melengestrol acetate. J Anim Sci, v.81, p.830-835, 2003.

Hill SL, Grieger DMK, Olson C, Jaeger JR, Dahlen CR, Underdahl SR, Bridges GA, Larson JE, Ahola JK, Fischer MC, Perry GA, Steckler TL, Whittier WD, Currin JF, Stevenson JS. Using estrus-detection patches to optimally time artificial insemination (AI) and improve pregnancy rates in suckled beef cows in a timed AI program. J Anim Sci, v.94, p.3703-3710, 2016.

Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. Effect of day of prostaglandin treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. Anim Reprod Sci, v.23, p.169-180, 1990.

Lima LA, Pinheiro VG, Cury JR, Barros CM. Addition of FSH, in contrast to eCG, does not increase pregnancy rates in anestrous Nelore (*Bos indicus*) cows treated with fixed-time AI protocol. Reprod Fertil Dev, v.22, p.170, 2010. Abstract.

Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R. Administration of prostaglandin F2 α during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. Biol Reprod., v.3, p.377-382, 2000.

Lopes MSB, Mendanha MF, Macedo GG, Sala RV, Batista EOS, Sá Filho MF, Ferrari S, Baruselli PS. Influence of estrus on follicle dynamics in synchronization of ovulation protocol for FTAI in anestrous Nelore cows. Anim Reprod, v.9, p.520, 2012.

Mantovani AP. Resposta imunológica conta a gonadotrofina coriônica equina (eCG) em novilha *Bos taurus* e *Bos indicus*. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

Marques MO, Morotti F, Silva CB, Ribeiro Júnior M, Silva RCP, Baruselli PS, Seneda MM. Influence of category—heifers, primiparous and multiparous lactating cows—in a large-scale resynchronization fixed-time artificial insemination program. J Vet Sci, v.16, p.367-371, 2015.

Martinez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Mapletoft RJ. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. Theriogenology, v.54, p.757-769, 2000.

Martins CM, Valentim R, Bombonato DS, Santos ICC, Baruselli PS. Follitropin was as efficacious as eCG in treating cows for fixedtime. Acta Sci Vet, v.38, p.731, 2010.

Martins JPN, Policelli RK, Neuder LM, Raphael W, Pursley JR. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. J Dairy Sci, v.94, p.2815–2824, 2011.

Martins T, Pugliesi G, Sponchiado M, Cardoso B, Silva K R, Gomes N S F, Cuadros D C, Silva M I S, Mello B P, Miyai D K C, Binelli M. Effect of AI on the incidence of short luteal lifespan in cows supplemented with P4 at early diestrus. Animal Reproduction, v.13, p.181, 2016.

Martins JPN, Pursley JR. Programas de fertilidade para vacas de leite, suas bases fisiológicas e os fatores críticos para seu sucesso. Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.160-169, 2016.

Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. Biol Reprod, v.45, p.598-604, 1991.

Meira C, Pessoa VM, Ferreira JCP, Araujo GHM, Gioso MM, Bicudo SD, Oba E, Orlandi C. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F2 α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. J Vet Sci, v.7, p.387-390, 2006.

Mello RRC, Ferreira JE, Mello MRB, Palhano HB. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. Rev Bras Reprod Anim, v.38, p.129-134, 2014.

Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. Theriogenology, v.72, p.179–189, 2009.

Mihm M, Baker PJ, Ireland JLH, Smith GW, Coussens PM, Evans ACO, Ireland JJ. Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle-Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence in Cattle. Biol Reprod, v.74, p.1051-1059, 2006.

Motta JCL, Colli MHA, Penteado L, Bayeux BM, Mingoti RD, Bó GA, Lugo LC, Rezende RG, Baruselli PS. Taxa de prenhez à IATF de novilhas nelore e cruzadas submetidas ao protocolo J-Synch (6 DIAS). Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.204, 2016.

Mulvehill P, Sreenan J. Improvement of fertility in postpartum beef cows by treatment with PMSG and progesterone. J Reprod Fertil., v.50, p.323-325, 1977.

Munro RK, Moore NW. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. J Reprod Fertil, v.73, p.353-359, 1985.

Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. Anim Reprod, v.9, p.223-230,



2012.

Miyamoto A, Shirasuna K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. *Anim Reprod*, v.6, p.47-59, 2009.

Nielson HR, Kelly DJ, Funston RN. Effect of delayed insemination of nonestrus beef heifers in a melengestrol acetate–prostaglandin F_{2α} timed artificial insemination protocol. *The professional animal Scientist*, v.32, p.445-447, 2016.

Nogueira E, Rodrigues WB, Silva AS, Borges JC, Silva KC, Anache NA, Bezerra AO, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Mingoti GZ. Aplicação de GnRh em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a IATF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.239, 2016. Resumo.

Nogueira E, Batista DSN, Costa Filho LCC, Dias AM, Silva JCB, Ítavo LCV. Pregnancy rate in lactating *Bos indicus* cows subjected to fixed-time artificial insemination and treated with different follicular growth inducers. *Rev Bras Zootec*, v.43, 2014.

Penteado L, Rezende RG, Mingoti RD, Colli MHA, Sá Filho MF, Santos FB, Motta JCL, Bayeux BM, Vieira LM, Baruselli PS. Taxa de prenhez de vacas nelore submetidas à ressincronização com início 14 ou 22 dias após prévia IATF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.235, 2016. Resumo.

Pessoa GA, Martini AP, Chaiben MFC, Vieira LM, Girotto RW, Pugliesi G, Santin T, Rubin MIB, Baruselli PS, Sá Filho M. Adjustment of the estradiol benzoate dose in the resynchronization protocol with unknown pregnancy status in suckled beef cows. *Anim Reprod*, v.12, p.610, 2015.

Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MC, Claro Júnior I, Baruselli PS, Brauner CC, Rubin MI, Corrêa MN, Leivas FG, Sá Filho MF. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.85, n. 5, p.792-799, 2016.

Pinheiro VG, Cury JRLM, Satrapa RA, Trinca LA, Loureiro B, Barros CM. Evaluation of the hypothalamus–pituitary axis response to exogenous GnRH, estradiol benzoate, and LH during the postpartum period in Nelore cows. *Theriogenology*, v.79, p.797-802, 2013.

Pugliesi G, Oliveria ML, Scolari SC, Lopes E, Pinaffi FV, Miagawa BT, Paiva YN, Maio JRG, Nogueira GP, Binelli M. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. *Reprod Dom Anim*, v.49, p.85-91, 2014.

Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira E, Maio JRG, Binelli M. Fertility response in suckled beef cows supplemented with long-acting progesterone after timed artificial insemination. In: 41th Meeting of the International Embryo Transfer Society, 2015, Versalhes. *Proceedings of 41th International Embryo Transfer Society*, p.98-98, 2015. Resumo.

Pugliesi G, Martins T, Santos FB, Silva JCB, Nishimura T, Maio JRG, Binelli M. Suplementação com progesterona de longa ação no início do diestro em vacas de corte: efeitos na fertilidade em programas de IATF e TETF. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.181, 2016a. Resumo.

Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JRG, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone. *Theriogenology*. v.85, p.1239-1248, 2016b. Resumo.

Pursley JR, Mee MO, Wilton MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p.915-923, 1995.

Rocha JM, Rabelo MC, Santos MHB, Machado PP, Bartolomeu CC, Neves JP, Lima PF, Oliveira MAL. IATF em vacas Nelore: avaliação de duas doses de eCG e reutilização de implantes intravaginais de progesterona. *Med Vet*, v.1, p.40-47, 2007.

Rodrigues ADP, Pereira MHC, Carvalho ER, Lemes AP, Martins T, Peres RFG, Graff HB, Valino LS, Carloto HM, Fontes PLP, Barbosa LFSP, Vasconcelos JLM. Association of puberty induction protocol and timed-AI protocol in Nelore heifers. *Anim Reprod*, v.9, p.480, 2012.

Rodrigues WB, Jara JP, Borges JC, Oliveira LOF, Abreu UPG, Batista DSN, Anache NA, Silva KC, Bezerra AO, Nogueira E. Eficiência das técnicas de manejo reprodutivo pós-inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte paridas. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.236, 2016. Resumo.

Rovani MT, Barreta MH, Ferreira R, Gasperin BG, Antoniazzi AQ, Festugatto R, Oliveira JFC, Gonçalves PBD. Luteolysis after the intravulvovaginal injection of prostaglandin F_{2α} in cattle: Systemic or local mechanism? *Livestock Science*, v.148, p.60-66, 2012.

Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, v.39, p.719-737, 1993.

Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v.72, p.210-218, 2009a.



- Sá Filho OG, Vilela ER, Geary TW, Vasconcelos JL.** Strategies to improve fertility in postpartum multiparous *Bos indicus* cows submitted to a fixed-time insemination protocol with gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2alpha. *J Anim Sci*, v.87, p.2806-2814, 2009b.
- Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bo GA, Baruselli PS.** Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, v.73, p.651-658, 2010a.
- Sá Filho MF, Torres-Júnior JRS, Penteadó L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, Castro e Paula LA, Sales JNS, Baruselli PS.** Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.182-187, 2010b.
- Sá Filho MF, Crespihlo AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cow. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.23-30, 2010c.
- Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS.** Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, v.76, p.455-463, 2011.
- Sá Filho MF, Marques MO, Girotto R, Santos FA, Sala RV, Barbuio JP, Baruselli PS.** Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*; v.81, p.284-290, 2014.
- Sales JNS, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS.** Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.124, p.12-18, 2011.
- Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacominia JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS.** Effects of Two Estradiol Esters (Benzoate and Cypionate) on the Induction of Synchronized Ovulations in *Bos Indicus* Cows Submitted to a Time Artificial Insemination Protocol. *Theriogenology*, v.78, p.510-516, 2012.
- Sales, JNS, Bottino, MP, Silva, LACL, Girotto, RW, Massoneto, JPM, Souza, JC, Baruselli, PS.** Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.86, p.2290-2295, 2016.
- Santos ICC, Martins CM, Valentim R, Baruselli PS.** Pregnancy rate in FTAI anestrus *Bos indicus* cows treated with a single dose of FSHp (Folltropin). *Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1151, 2007.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S A, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC.** Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.*, v.85, p.2803-2812, 2002.
- Scheeren VFC, Zanatta GM, Pessoa GA, Martini AP, Trentin JM, Casarin JBS, Fiorenza MF, Baruselli PS, Sá Filho MF, Rubin MIB.** Delayed insemination time in taurine heifers that did not display estrus after progesterone device removal. *Anim Reprod*, v.12, p.612, 2015.
- Silva MAV.** Uso de estradiol e GnRH na indução da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF com sêmen sexado. São Luís, 2012. 76f Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.
- Sousa LMMC, Mendes GP, Campos DB, Baruselli PS, Papa PC.** Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression Gonadotro of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. *Plos One*, v.11, p.e01640891, 2016.
- Souza AHA, Gumen EPB, Silva AP, Cunha Guenther JN, Peto C, Caraviello MDZ, Wiltbank MC.** Supplementation with Estradiol-17 β Before the Last Gonadotropin- Releasing Hormone Injection of the Ovsynch Protocol in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*, v.90, p.4623-4634, 2007.
- Tang OS, Gemzell-Danielsson K.** Misoprostol: Pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v.99, p.S160-S167, 2007.
- Teixeira AA, Vieira LM, Mingoti RD, Rezende RG, Motta JCL, Girotto RW, Baruselli PS.** Efeito da administração de PGF2 α no início do protocolo de IATF e do dispositivo intravaginal de progesterona (Fertilcare 600®) em novilhas da raça nelore (*Bos indicus*). *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, p.219, 2016. Resumo.
- Thomas JM, Poock SE, Eilersieck MR, Smith MF, Patterson DJ.** Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *J Anim Sci*, v.92, p.4189-4197, 2014.
- Torres-Júnior JRS, Aguiar HMVB, Cavalcanti PH.** Reproductive ultrasonography for use of high cost semen in FTAI programs. Annual Meeting SBTE, 25th, Cambuco, CE, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39(Suppl 1), 2011. Abstract.
- Torres-Júnior JRS, Penteadó L, Sales JNS, Sá Filho MF, Ayres H, Baruselli PS.** A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial



- insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. *Anim Reprod Sci*, v.151, p.9-14, 2014.
- Trentin JM, Schenatto RO, Araujo LB, Fiorenza MF, Baioco AP, Jacques TG, Casarin JBS, Martini AP, Pessoa GA, Rubin MIB.** Gonodotrofina coriônica equina (eCG) na IATF em bovinos de corte: estudo retrospectivo. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, 2016. p.217. Resumo.
- Valdecabres-Torres X, García-Roselló E, García-Muñoz A, Cuervo-Arango J.** Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. *J Dairy Sci*, v.95, p.4389-4395, 2012.
- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC.** Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.52, p.1067-1078, 1999.
- Vasconcelos JLM, Filho OGS, Perez GC, Silva ATN.** Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus×Nelore cows. *Anim Reprod Sci*, v.111, p.302-311, 2009.
- Vieira LM, Sá Filho MF, Pugliesi G, Guerreiro BM, Cristaldo MA, Batista EOS, Freitas G, Carvalho FJ, Guimaraes LHC, Baruselli PS.** Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color Doppler. *Anim Reprod*, v.11, p.378, 2014.
- Walker WL, Nebel RL, Mcgilliard ML.** Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.79, p.1555-1561, 1996.
- Wenzinger B, Bleul U.** Effect of a prostaglandin F2 α analogue on the cyclic corpus luteum during its refractory period in cows. *Veterinary Research*, v.8, p.220, 2012.
- Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JLM, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN, Gumen A.** Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.76, p.1568-1582, 2011.
- Yan L, Robinson R, Shi Z, Mann G.** Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: a metaanalysis *Theriogenology*, v.85, p.1390-1398, 2016.
- Yavas Y, Walton JS.** Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v.54, p.25-55, 2000a.
- Yavas Y, Walton JS.** Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v.54, p.1-23, 2000b.
- Zabala N, Repiso G, Miranda JI, Cutaia L.** Efecto de la aplicación de gnrh 12 horas antes de la iatf en vaquillonas de 24 meses que no manifiestan celo sobre los porcentajes de preñez. *Anais... 10º Simposio Internacional de Reproducción Animal Córdoba, Argentina 4, 5 y 6 de Julio de 2013a*, p.329. Resumo.
- Zabala N, Repiso G, Miranda JI, Cutaia L.** efecto de la aplicación de gnrh 12 horas antes de la iatf en vacas braford con cría al pié que no manifiesta celo sobre los porcentajes de preñez. *Anais...10º Simposio Internacional de Reproducción Animal Córdoba, Argentina 4, 5 y 6 de Julio de 2013b*, p.330. Resumo.
- Zabala N, Repiso G, Miranda JI, Cutaia L.** Efecto de la aplicación de gnrh 12 horas antes de la iatf en vacas braford sin cría al pié que no manifiesta celo sobre los porcentajes de preñez. *Anais... 10º Simposio Internacional de Reproducción Animal Córdoba, Argentina 4, 5 y 6 de Julio de 2013c*, p.331. Resumo.
-