

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS ANGUS SUBMETIDAS À  
IATF UTILIZANDO CIPIONATO DE ESTRADIOL OU ANÁLOGO DO  
HORMÔNIO LIBERADOR DAS GONADOTROFINAS COMO INDUTORES  
DE OVULAÇÃO”**

**EDUARDO PRADEBON DA SILVA**

**PORTO ALEGRE**  
**2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“Desempenho reprodutivo de novilhas Angus submetidas à IATF utilizando cipionato de estradiol ou análogo do hormônio liberador das gonadotrofinas como indutores de ovulação”

**Autor:** Eduardo Pradebon da Silva

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Fisiopatologia da Reprodução de Bovinos

**Orientador:** Prof. Dr. João Batista Souza Borges

PORTO ALEGRE

2016

Eduardo Pradebon da Silva

DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS ANGUS SUBMETIDAS À IATF  
UTILIZANDO CIPIONATO DE ESTRADIOL OU ANÁLOGO DO HORMÔNIO  
LIBERADOR DAS GONADOTROFINAS COMO INDUTORES DE OVULAÇÃO

Aprovado em 05 de Janeiro de 2017

APROVADO POR:

---

Dr. João Batista Souza Borges

Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr. Paulo Ricardo Loss Aguiar

Membro da Comissão

---

Dr. André Dalto

Membro da Comissão

---

Dr. Cristiano Feltrin

Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Grande Arquiteto do Universo pelo dom da vida e a oportunidade de conviver com todos que compartilharam meu caminho.

Aos meus pais agradeço pelo exercício de paciência de criar os filhos através do exemplo e deixar que cada um aprenda através das suas próprias decepções e conquistas.

Ao meu orientador João Batista Borges por conceder a oportunidade de continuar o aprimoramento profissional e por todos os ensinamentos obtidos durante este importante período da minha vida.

Aos membros da banca examinadora por despenderem seu tempo e conhecimento em contribuir para tornar este trabalho melhor.

Aos meus colegas da Unidade de Reprodução de Bovinos pela disponibilidade de ajudar em desempenhar cada etapa deste trabalho, sempre com bom humor e muita dedicação.

Às professoras Ana Paula Mellagi e Mari Bernardi que auxiliaram nas análises dos dados deste trabalho.

Ao amigo e colega Marcelo Maronna Dias pelo empenho, exemplos e ensinamentos, bem como pelas propriedades que disponibilizou para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores das propriedades, os quais sempre nos receberam de braços abertos e não mediram esforços para que o trabalho se realizasse.

Ao amigo e colega Márcio Chaiben por confiar em nossa equipe e capacidade em realizar o trabalho, e à empresa Agener União pelo auxílio com os tratamentos hormonais utilizados.

## RESUMO

### DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS ANGUS SUBMETIDAS À IATF UTILIZANDO CIPIONATO DE ESTRADIOL OU ANÁLOGO DO HORMÔNIO LIBERADOR DAS GONADOTROFINAS COMO INDUTORES DE OVULAÇÃO

Autor: Eduardo Pradebon da Silva

Orientador: Prof. Dr. João Batista Souza Borges

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da presença de corpo lúteo (CL) no início do protocolo de inseminação artificial a tempo fixo (IATF), no diâmetro do folículo ovulatório (DFO), na expressão de estro e na taxa de prenhez usando cipionato de estradiol (CE) ou GnRH como indutor de ovulação em novilhas de corte. No dia 0, novilhas [n = 414; 317 ± 23 kg; 3,08 ± 0,21 score de condição corporal (escala de 1 a 5) entre 22 e 24 meses de idade] receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (P4) e foram administrados 2 mg de benzoato de estradiol, IM. No dia 8, o dispositivo foi removido e as novilhas receberam 500 µg de cloprostenol sódico IM e foram divididas em dois grupos: CE [n = 213; 0,5 mg de CE, IM, no dia 8] e GnRH [n = 201; 25 µg de Licerelina, IM, no dia da IATF] e a IATF foi realizada 50 h após a remoção do dispositivo. As novilhas tiveram a região sacral pintada para verificar a expressão do estro entre a remoção do dispositivo de P4 e a IATF. No dia 0, foram realizados exames ultrassonográficos para verificar a presença de CL (com CL = 213, sem CL = 202), no dia 10 para medir o DFO e no dia 11 para confirmar a ovulação. As novilhas foram classificadas em 3 grupos de acordo com o DFO: pequeno ( $\leq 9,5$ mm), médio (9,6-11,5mm) e grande ( $\geq 11,6$ mm) para avaliar seu efeito na expressão de estro e prenhez. A expressão de estro foi confirmada quando a tinta estava removida no dia 10. A expressão de estro foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo CE em comparação com o grupo GnRH. O DFO diferiu ( $P < 0,05$ ) de acordo com a presença de CL ( $P < 0,05$ ), mas foi semelhante entre os tratamentos. A taxa de ovulação não diferiu nos grupos CE e GnRH. As taxas de prenhez foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre os grupos CE e GnRH, no entanto, a taxa de prenhez foi maior nas novilhas que expressaram estro ( $P < 0,05$ ), do que naquelas que não expressaram. A presença de CL no início do protocolo de IATF esteve associada a maior taxa de prenhez ( $P < 0,05$ ) no grupo GnRH em relação ao grupo CE, mas não diferiu entre novilhas sem CL. A manifestação de estro para novilhas tratadas com GnRH aumenta de acordo com DFO. O grupo CE apresenta alta manifestação de estro independente do DFO. A taxa de prenhez é maior à medida que o DFO aumenta. Em conclusão, as novilhas com CL no início do protocolo de IATF possuem maior folículo ovulatório, e quando tratadas com GnRH como indutor de ovulação atingem maiores taxas de prenhez. O tamanho do folículo ovulatório foi associado com o comportamento de estro e as taxas de prenhez nos tratamentos de CE e GnRH.

Palavras chave: novilhas de corte, IATF, cipionato de estradiol, GnRH, ovulação

## ABSTRACT

### REPRODUCTIVE PERFORMANCE ANGUS HEIFERS SUBMITTED TO A TAI USING ESTRADIOL CYPIONATE OR GONADOTROPIAN RELEASING HORMONE ANALOGUE AS OVULATION INDUCTORS

Author: Eduardo Pradebon da Silva

Advisor: Dr. João Batista Souza Borges

The aim of this study was to evaluate the effect of presence of corpus luteum (CL) at the onset of timed AI (TAI) protocol in ovulatory follicle diameter (OFD), estrus expression and pregnancy rate using estradiol cypionate (EC) or GnRH as ovulation inductor in beef heifers. On day 0, heifers [ $n=414$ ;  $317\pm 23$  kg;  $3.08\pm 0.21$  body condition score (1 to 5 scale) and 22-24 months of age] received a 1g progesterone (P4) intravaginal device and 2 mg of estradiol benzoate, IM,. On day 8, device was removed, heifers received 500  $\mu$ g of sodium cloprostenol, IM, and were divided in two groups: EC [ $n=213$ ; 0.5mg EC, IM, on day 8] and GnRH [ $n=201$ ; 25  $\mu$ g of Licerelin, IM, at TAI] TAI was performed 50 h after device removal. The heifers had the base of the tail painted to verify estrus expression between P4 device removal and IATF. On day 0, ultrasound examinations were performed to verify the presence of CL (with CL = 213, without CL = 202). On day 10 to measure OFD and on day 11 to confirm ovulation. Heifers were classified into three groups according to OFD: small ( $\leq 9.5$  mm), medium (9.6-11.5 mm) and large ( $\geq 11.6$  mm) to evaluate their effect on estrus expression and pregnancy rate. Estrus expression was confirmed when ink marking was removed on day 10. Estrus expression was higher ( $P < 0.05$ ) in the EC group compared to GnRH group. The OFD differed ( $P < 0.05$ ) according to the presence of CL ( $P < 0.05$ ), but was similar between the treatments. The ovulation rate did not differ in CE and GnRH groups. Pregnancy rates were similar ( $P > 0.05$ ) between the EC and GnRH groups, however, the pregnancy rate was higher in heifers who expressed estrus ( $P < 0.05$ ) than in those who did not express it. The presence of CL at the beginning of the IATF protocol was associated with a higher pregnancy rate ( $P < 0.05$ ) in the GnRH group in relation to the EC group, but did not differ between heifers without CL. The estrus manifestation for heifers treated with GnRH increases as the DFO increases, while the EC heifers has a high estrus manifestation independent of the DFO. The pregnancy rate also increases as DFO increases. In conclusion, heifers with CL at the beginning of the IATF protocol have increased ovulatory follicle size, and when treated with GnRH, as an ovulation inducer, attained higher pregnancy rates. The size of the ovulatory follicle was associated with higher estrus behavior and higher pregnancy rates in the EC and GnRH treatments.

Keywords: beef heifers, TAI, estradiol cypionate, GnRH, ovulation

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1. Objetivo geral .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 FOLICULOGÊNESE .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR DOS BOVINOS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL EM BOVINOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 INTRODUCTION.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 RESULTS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 DISCUSSION .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5 REFERENCES.....</b>	<b>31</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A sincronização de estro e a inseminação artificial são as principais biotécnicas reprodutivas empregadas na bovinocultura de corte (SEIDEL, 1995). O uso da inseminação artificial a tempo fixo (IATF) eliminou a necessidade de observação de estro, diminuindo o tempo de trabalho e de manejo com os animais (PATTERSON *et al.*, 2003; COLAZO *et al.* 2014). Além disso, oferece melhoramento genético, padronização de terneiros, concentração dos partos e diminuição da estação de monta (SÁ FILHO *et al.*, 2013). Contudo, segundo ASBIA (2014) no Brasil apenas 11,9% das fêmeas de corte em idade reprodutiva são inseminadas, demonstrando o quanto estas biotécnicas reprodutivas podem continuar crescendo.

Em novilhas de reposição, a utilização da IATF permite a concepção das fêmeas no início da estação de acasalamento, encurtando este período. Ainda, novilhas que se tornam prenhes no início da estação de acasalamento parem mais cedo e conseqüentemente possuem um intervalo pós-parto até o início da estação de monta subsequente maior, o que permite que estes animais consigam gestar novamente (SHORT e BELLOWS, 1971; SÁ FILHO *et al.*, 2013). Em novilhas, além da escolha adequada de um protocolo de IATF, outro ponto importante para alcançar altas taxas de prenhez é a seleção antes do início do protocolo. Novilhas selecionadas pela presença do corpo lúteo (CL) no início do protocolo de IATF obtiveram maior taxa de prenhez em relação as que não possuíam (GUTIERREZ *et al.*, 2014). Holm *et al.* (2009) mostram que esta seleção é um melhor indicador de desempenho reprodutivo em novilhas quando comparado ao peso vivo, escore de condição corporal e idade. Essa resposta em novilhas cíclicas é atribuída a uma provável regulação do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal (BYERLEY *et al.*, 1987). A progesterona regula este eixo elevando o número de receptores de GnRH e aumentando a quantidade de LH armazenado na hipófise para a ovulação (ANDERSON *et al.*, 1996; HALL *et al.*, 1997). Isso determina maior tamanho do folículo ovulatório no ciclo subsequente, responsividade ao LH, área luteal e conseqüentemente melhores taxas de prenhez (MANN e LAMMING, 2001).

Os protocolos de IATF são baseados em quatro pontos principais: indução de uma nova onda de crescimento folicular; controle do crescimento folicular até o estágio de folículo ovulatório; sincronização da inserção e retirada da fonte de progesterona e indução da ovulação em todos os animais (BARUSELLI *et al.*, 2006; COLAZO *et al.*,



2014). Para indução da ovulação existem alternativas como a utilização de ésteres de estradiol (cipionato de estradiol (CE) ou benzoato de estradiol (BE)) ou análogos do GnRH (AMBROSE *et al.*, 2005; USLENGHI *et al.*, 2014; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015). Esses hormônios possuem diferentes farmacocinéticas em relação à concentração plasmática e a indução do pico de LH, (STEVENSON *et al.*, 2004; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015), o que altera a distribuição das ovulações (PURSLEY *et al.*, 1995; USLENGUI *et al.*, 2014). Além da distribuição da ovulação, outros fatores importantes para alcançar sucesso na IATF são o diâmetro do folículo ovulatório (Perry *et al.*, 2007) e a manifestação de estro entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF (Sá Filho *et al.*, 2011; Bishop *et al.*, 2016). Portanto é fundamental que, além da escolha adequada dos animais que entrarão no programa de IATF, seja constante o aprimoramento e o desenvolvimento de protocolos que se adaptem à vacas ou novilhas, visando uma maior rentabilidade da técnica empregada de acordo com a categoria animal em questão.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas de corte Angus selecionadas pela presença do CL no início do programa de IATF, utilizando CE ou GnRH como indutores da ovulação.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar a taxa de manifestação de estro, diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação e prenhez em novilhas de corte submetidas à protocolo de IATF com a utilização de GnRH ou CE como indutores da ovulação;

Relacionar a presença do CL no início do protocolo de IATF com o diâmetro do folículo ovulatório, taxa de manifestação de estro e taxa de prenhez aos 30 dias após a IATF;

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 FOLICULOGÊNESE**

O ovário é responsável pela produção dos gametas femininos e de hormônios essenciais para a concepção e manutenção da gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2000). Nos bovinos, os folículos se formam na vida fetal e, ao redor dos 150 dias de gestação, as fêmeas bovinas já possuem todos os folículos formados com estágios pré-antrais e antrais iniciais ainda no terço final da gestação (ROCHE, 1996; FORTUNE, 2003). Os folículos dos bovinos são classificados de acordo com o número de camadas que rodeiam o oócito externamente, sendo três pré-antrais, ou seja, os que ainda não possuem cavidade com líquido (antro), primordiais, primários e secundários, e depois passam a ser chamados de antrais ou terciários quando ocorre a formação do antro (FORTUNE, 2003).

A transformação de um folículo primordial em folículo ovulatório dura aproximadamente 60 dias (LUSSIER *et al.*, 1987). Inicialmente os folículos pré-antrais não são dependentes da atuação das gonadotrofinas. Folículos primordiais possuem apenas uma única camada de células achatadas ao seu redor, já os folículos primários possuem células cuboides ao seu redor (SENGER, 2005). O folículo passa a ser chamado de secundário quando há formação de duas ou mais camadas de células cuboides, então quando ocorre o acúmulo de líquido folicular no antro o folículo torna-se terciário (PICTON, 2000; FORTUNE, 2003). No estágio de folículo terciário, o folículo torna-se dependente das gonadotrofinas, e seu crescimento é dividido em quatro diferentes fases: recrutamento, seleção, dominância e atresia ou ovulação (WEBB *et al.*, 2004). Para melhor entendimento, essas fases serão descritas abaixo, juntamente com as fases do ciclo estral dos bovinos.

### **2.2 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR DOS BOVINOS**

Os bovinos são animais poliéstricos anuais, ou seja, possuem atividade cíclica durante todo ano. O ciclo estral dos bovinos possui duração média de 21 dias, variando de 17 a 24, e é definido pelo ínterim entre duas manifestações de estro seguidas de ovulação em fêmeas adultas (KOJIMA, 2003). O ciclo estral é didaticamente dividido em quatro partes: proestro, estro, metaestro e diestro. Estas frações são agrupadas em duas diferentes grandes fases que levam em consideração a ação hormonal sobre elas, sendo a fase folicular a que possui ação do estradiol e compreende o proestro e o estro, e

a fase luteínica que possui ação da progesterona e abrange o metaestro e o diestro (MACMILLAN e BURKE, 1996). Durante essas fases existe uma complexa interação entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que regula o desenvolvimento das estruturas ovarianas como folículos e corpo lúteo (CL), bem como a produção de hormônios por cada órgão deste eixo (KOJIMA, 2003).

Em 1960 RAJAKOSKI propôs a teoria das ondas foliculares baseada na observação anatômica e histológica de ovários de novilhas, neste estudo o autor sugere que durante o ciclo estral das fêmeas existem duas ondas de crescimento. Só quase três décadas depois essa teoria foi confirmada com o advento da ultrassonografia, método que permitiu elucidar vários fenômenos da dinâmica folicular de diferentes espécies (PIERSON e GINTHER 1988; GINTHER *et al.*, 1989a). Esses autores confirmaram a teoria do crescimento folicular em ondas e mostraram que o ciclo estral dos bovinos possui de duas a quatro ondas foliculares. Isso implica em diferentes padrões de crescimento e atresia (GINTHER e BASHIR, 2013) e também altera a fertilidade dos folículos (TWONSON *et al.*, 2002).

O crescimento inicial de um “pool” de 5 a 20 folículos é independente da ação do hormônio folículo estimulante (FSH) (WEBB *et al.*, 2004). Cada onda de crescimento folicular é precedida de um pulso de FSH que recruta um grupo de folículos (ADAMS, 1998). Neste período ocorre mudanças nos padrões de expressão do RNA mensageiro para receptores das gonadotrofinas (rFSH e rLH) e também de enzimas chave na produção de estrógenos como a enzima citocromo P450 (BAO e GARVERICK, 1998), assim ocorre o aumento da produção de estradiol e inibina pelos folículos (WEBB, 1999).

O estradiol e a inibina atuam na hipófise anterior diminuindo as concentrações de FSH, desta maneira ocorre a seleção de folículos que adquirem capacidade de crescer mesmo com baixas concentrações de FSH (BLEACH *et al.*, 2001). A diminuição de FSH faz com que ocorra o fenômeno chamado de dominância, na qual o futuro folículo dominante continua crescendo e os subordinados começam a regredir e neste momento os folículos dominantes possuem entre 8 e 8,5 mm de diâmetro (KULICK *et al.*, 1999). Em folículos com mais de 8 mm de diâmetro há um aumento na quantidade de rLH nas células da granulosa, corroborando com seu crescimento e produção de estradiol em uma fase LH dependente (BAO e GARVERICK, 1998). Em vista disso, o momento da

divergência entre os dois maiores folículos selecionados é precedido por uma elevação nas concentrações de LH (KULICK *et al.*, 1999). Outros fatores importantes na seleção de folículos dominantes são o sistema IGF e as IGFBPs (proteínas ligantes dos fatores de crescimento semelhante à insulina) (ARMSTRONG *et al.*, 2000). A concentração de IGF-I livre no fluido folicular do folículo dominante é maior em relação à dos folículos subordinados (BEG *et al.*, 2002) e também contribui para o crescimento folicular e a produção de estrógeno (FORTUNE *et al.*, 2003).

O folículo dominante adquire capacidade ovulatória a partir de 10 mm de diâmetro e, à medida que o folículo cresce a capacidade em responder ao pico de LH, ou seja, de ovular, aumenta (SARTORI *et al.*, 2001). Após se tornar dominante, o folículo pode seguir por dois caminhos: a atresia ou a ovulação. Porém, este destino depende em qual fase do ciclo estral a fêmea bovina se encontra (GINTHER *et al.*, 1997). Logo após a ovulação, durante o metaestro acontece o aumento das concentrações sanguíneas de progesterona, a qual começa a ser produzida pelo CL (GINTHER *et al.*, 1989b). A progesterona promove um “feedback” negativo sobre o hipotálamo, diminuindo a pulsatilidade do GnRH, e conseqüentemente de LH (ECHTERNKAMP e HANSEL, 1973). Esse bloqueio da progesterona sobre a liberação dos pulsos de LH faz com que o folículo dominante da primeira ou segunda onda folicular não mature e nem produza estradiol suficiente para induzir o pico de LH necessário para a ovulação, ocorrendo a atresia destes folículos (SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER *et al.*, 1989a).

O CL, formado pelas células do folículo que ovulou, inicia a produção de progesterona ao redor do 4º dia pós-ovulação e, à medida que aumenta de tamanho, também produz mais progesterona, atingindo concentrações máximas entre o dia 7 e o 12 do ciclo estral (DONALDSON e HANSEL, 1965; KOJIMA, 2003). A progesterona é secretada por dois tipos de células, as luteais pequenas e grandes, originadas das células da teca e granulosa, respectivamente. As células luteais grandes produzem cerca de sete vezes mais progesterona que as pequenas e também são responsáveis pela produção de ocitocina luteal (NISWENDER *et al.*, 2000). Essas concentrações permanecem altas até que ocorra luteólise, no dia 18 ou 19 do ciclo estral, ou 3 a 4 dias antes da manifestação do estro (KOJIMA, 2003).

No final do diestro de uma fêmea não gestante a progesterona inibe a expressão de seus receptores presentes no endométrio, e deixa de bloquear a expressão dos

receptores de ocitocina (WATHES e HAMON, 1993). Os receptores para estradiol também aumentam no final do diestro, fato que ocorre concomitantemente com a dominância do folículo ovulatório da última onda, o qual poderá ovular (ROBINSON *et al.*, 2001). Com o crescimento do folículo ovulatório dominante, a concentração de estradiol se eleva e estimula a expressão dos receptores de ocitocina no endométrio (GINTHER *et al.*, 1989; ROBINSON *et al.*, 2001). Além disso, quando não há presença do embrião para sinalizar a gestação, não existe ação do interferon-tau que suprime a expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina, inibindo os mecanismos luteolíticos (SPENCER e BAZER, 1995). Portanto, sem a presença do embrião e com o aumento nos níveis de estrógeno há liberação de ocitocina pela hipófise posterior, a qual se liga em seus receptores e estimula a síntese e liberação de prostaglandina F2 $\alpha$  (WATHES e LAMMING, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2009). Em bovinos a transferência da prostaglandina F2 $\alpha$  do útero aos ovários ocorre pelo mecanismo de contracorrente, já que anatomicamente a veia uterina é enovelada na artéria ovariana, fazendo com que este hormônio chegue ao seu local de ação rapidamente, sem entrar na circulação sistêmica (GINTHER, 1974; SILVIA *et al.*, 1991).

A luteólise inicia ao redor do 15<sup>o</sup>-18<sup>o</sup> dia do ciclo estral, quando o útero começa a liberar pulsos de prostaglandina F2 $\alpha$  (TATCHER *et al.*, 2001) e é relacionada com a presença de um folículo dominante, o que explica um ciclo estral mais longo em fêmeas que possuem três ondas foliculares ao invés de duas (GINTHER *et al.*, 1989). A prostaglandina F2 $\alpha$  se liga aos seus receptores nas células do CL bloqueando a produção de progesterona e também fazendo com que as células luteais liberem ocitocina, iniciando um mecanismo de retroalimentação entre os pulsos de prostaglandina uterina e de ocitocina luteal (WATHES e LAMMING, 1995; AROSH *et al.*, 2004). A luteólise completa é definida pelas reduções basais nas concentrações de progesterona após quatro pulsos distintos de prostaglandina F2 $\alpha$  que acontecem em um intervalo de 30 horas (KINDAHL *et al.*, 1976).

Quase imediatamente após o declínio da concentração de progesterona há um aumento na frequência dos pulsos de LH (KINDER *et al.*, 1996). O proestro é caracterizado por esse aumento nas frequências dos pulsos de LH até próximo ao pico de LH que, juntamente com o comportamento estral, marca o início do estro (IMAKAWA *et al.*, 1986). Com o aumento dos pulsos de LH o folículo ovulatório dominante consegue completar sua maturação e desenvolvimento final (DAY, 2015).

Durante o proestro o diâmetro folicular e a produção de estradiol pelas células da granulosa aumentam à medida que o proestro progride (BRIDGES *et al.*, 2010). O estradiol produzido pelo folículo na ausência de progesterona desencadeia um “feedback” positivo no hipotálamo sobre a liberação de GnRH, ocasionando o pico de LH que levará à ovulação do folículo dominante (FORTUNE *et al.*, 1994). Neste momento ocorrem alterações no fluido folicular através de mudanças nas rotas de enzimas esteroidogênicas, que acarretam na diminuição da produção de estradiol e no aumento da produção de progesterona, iniciando o processo de luteinização das células (KOMAR *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2012). A ovulação, processo pelo qual o ócito é liberado do folículo, ocorre em média 30 horas após o início ou 12 horas após o término do estro, e em bovinos acontece no metaestro, iniciando um novo ciclo estral (PURSLEY *et al.*, 1997; SENGER *et al.*, 2005). Assim o balanço entre os hormônios que controlam a dinâmica folicular é o que irá determinar se um folículo sofrerá atresia ou completará seu desenvolvimento até ovular (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

### **2.3 MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL EM BOVINOS**

Com os constantes estudos e aprimoramento dos conhecimentos sobre a fisiologia do ciclo estral dos bovinos, é que biotécnicas como a manipulação hormonal do ciclo estral e a inseminação artificial se tornaram as principais ferramentas disponíveis para os produtores aumentarem a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos (SEIDEL, 1995). Todos os tratamentos para manipulação do ciclo estral são baseados nas quatro diferentes fases do ciclo e em como ocorre o padrão de desenvolvimento folicular em bovinos (COLAZO *et al.*, 2014)

Inicialmente, os programas de controle do ciclo estral para IA eram baseados na regressão do CL através da utilização de análogos da prostaglandina F2 $\alpha$  com observação de comportamento estral entre 18 e 80 horas após a aplicação, ou em duas aplicações intercaladas para reduzir o tempo de observação de estro (LAUDERDALE *et al.*, 1974; SEGUIN *et al.*, 1978). Outro avanço importante em relação à manipulação do ciclo estral é a utilização de progestágenos exógenos (orais ou dispositivos intravaginais) que mimetizam o período luteal e previnem o comportamento estral, sendo utilizados para atrasar a manifestação de estro após a luteólise natural ou induzida (BROWN *et al.*, 1988; LUCY *et al.*, 2001). O uso da ultrassonografia propiciou o conhecimento sobre o desenvolvimento das ondas foliculares e como as estruturas

ovarianas se comportam ao longo do ciclo (GINTHER *et al.*, 1989a; SIROIS e FORTUNE, 1988). Assim, estudos sobre a resposta do folículo dominante ou ovulatório frente à aplicação de GnRH e conseqüentemente ao LH, luteinizando ou ovulando, respectivamente (BAO e GARVERICK, 1998) e como o CL adquire capacidade de responder ao tratamento com prostaglandina F<sub>2α</sub> entre 5 e 7 dias após a ovulação (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1995) é que propiciaram o desenvolvimento de protocolos de IATF (PURSLEY *et al.*, 1997). A IATF é baseada em quatro pontos principais: 1) induzir o crescimento de uma nova onda folicular; 2) controlar a duração e o período de crescimento do folículo até a fase pré-ovulatória; 3) retirar a fonte de progesterona e; 4) induzir a ovulação em todos os animais (COLAZO *et al.*, 2014; DAY, 2015).

O passo inicial em um protocolo de IATF é controlar o início do crescimento de uma nova onda folicular, que pode ser induzida através da aplicação de hormônios ou através da ablação folicular (BÓ *et al.*, 1995). Ablação folicular por meio de ultrassonografia através de agulha guiada consiste em extrair o conteúdo líquido folicular de folículos maiores que 5mm, o que estimula o crescimento de uma nova onda (BERGFELT *et al.*, 1994). A utilização de análogos do GnRH ou LH faz com que o folículo dominante, independente da fase em que se encontra, ovule ou luteinize (BAO e GARVERICK, 1998; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015). Já o uso de ésteres de estradiol juntamente com uma fonte exógena de progesterona provoca atresia do folículo dominante iniciando outra onda de crescimento folicular (BO *et al.*, 1995). Apesar de todos esses métodos serem eficazes em induzir o crescimento folicular, existe uma diferença entre a aplicação de um dos métodos e o intervalo de início da nova onda (MARTINEZ *et al.*, 2000). A utilização de um dispositivo de progesterona sozinho ou associado com benzoato de estradiol, GnRH ou ablação folicular faz com que o início da nova onda ocorra, respectivamente, com 5, 4, 2 e 1,5 dias após o início do tratamento (MARTINEZ *et al.*, 2000). Essas disparidades implicam em diferentes idades dos folículos ovulatórios ao final do protocolo, o que altera a fertilidade do oócito em novilhas e vacas de corte (ABREU *et al.*, 2014a; ABREU *et al.*, 2014b)

Protocolos de IATF podem ou não conter fonte exógena de progesterona (COLAZO *et al.*, 2014). Um dos primeiros protocolos de IATF (OVSYNCH) proposto por Pursley *et al.* (1997) não utilizava fonte exógena de progesterona e, um dos principais problemas relatados pelos autores era a manifestação de estro que ocorria fora do período determinado, impedindo a IA dessas fêmeas. A utilização de progestágenos



nestes protocolos impede a manifestação de estro e ovulações antecipadas, além de outros efeitos benéficos que elevam as taxas de prenhez (LAMB *et al.*, 2001; MARTÍNEZ *et al.*, 2002). Além disso, em protocolos que utilizam ésteres de estradiol, essa associação se faz necessária para o controle do crescimento folicular e a prevenção do comportamento estral (BÓ *et al.*, 1995). Vários estudos mostram que a concentração de progesterona durante o protocolo pode interferir no crescimento do folículo ovulatório, diminuindo seu diâmetro no momento da IATF (DADARWAL *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014) o que reduz as taxas de prenhez (PERRY *et al.* 2007, SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Por outro lado, Cunha *et al.* (2008) demonstram como altas concentrações de progesterona são essenciais para altas taxas de concepção. Vacas que possuíam baixa concentração de progesterona durante o crescimento folicular apresentaram menor taxa de prenhez em relação as que possuíam progesterona alta (37,1% x 51,0%). Os autores ainda observou que vacas que possuíam altas concentrações de progesterona apresentavam menores perdas embrionárias/fetais entre 30 e 60 dias em relação as que não possuíam (6,8% x 14,3%). Da mesma forma, Bisinotto *et al.* (2010) mostraram como altas concentrações de progesterona no início do protocolo de IATF aumentam taxas de prenhez. Rivera *et al.* (2011), em um experimento com vacas estimuladas para superovulação, mostraram que a qualidade dos embriões de vacas que possuíam altas concentrações de progesterona durante o protocolo era superior à de vacas com baixas concentrações. Esse fato pode ser atribuído a um desenvolvimento folicular mais saudável que produz um oócito com maior qualidade, melhorando a fecundação e o desenvolvimento embrionário subsequente (WILTBANK *et al.*, 2012).

Garantir a remoção das fontes de progesterona, sejam elas exógenas (dispositivos de progesterona) ou endógenas (CL), ao final do protocolo é outro fator muito importante para alcançar sucesso na IATF (WILTBANK *et al.*, 2012; COLAZO *et al.*, 2014). A queda da progesterona permite uma maior liberação e frequência dos pulsos de LH (KINDER *et al.*, 1996), aumentando o crescimento e maturação final do folículo ovulatório (DAY, 2015) o que aumenta a responsividade ao LH (SARTORI *et al.*, 2001) e também possui relação positiva com a taxa de prenhez, tanto em novilhas (PERRY *et al.*, 2007) quanto em vacas (PERRY *et al.*, 2005; SÁ FILHO *et al.*, 2010). Existem dois análogos de prostaglandina F<sub>2α</sub> capazes de induzir a luteólise, o dinoprost e o cloprostenol (WILTBANK *et al.*, 2012). Martins *et al.* (2011) realizaram um

experimento comparando as diferenças entre essas duas alternativas para indução da luteólise. Os autores encontraram diferença entre os dois hormônios na redução das concentrações de progesterona somente até 12 horas após a sua aplicação, depois desse período a queda nas concentrações de progesterona foram similares e os dois produtos se mostraram eficazes.

Entretanto, vários trabalhos mostram que existem falhas no processo de luteólise em protocolos de IATF (SOUZA *et al.*, 2007; BRUSVEEN *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011). Nesses estudos vacas com pequeno aumento nas concentrações de progesterona no momento da IA apresentaram redução na fertilidade. Wiltbank *et al.* (2014) reportaram que vacas que possuíam concentrações de progesterona maiores que 0,4 ng/mL apresentaram menor taxa de prenhez após a IATF. Outros estudos em fêmeas que foram inseminadas após a detecção de estro também mostram que concentrações de progesterona acima de 0,5 ng/mL no momento da IA causam redução na fertilidade (WALDMANN *et al.*, 2001; GHANEM *et al.*, 2006). Existem dois métodos para garantir a redução na concentração de progesterona no momento da IA, aumentar a dose do agente luteolítico ou fazer duas aplicações intercaladas (WILTBANK *et al.*, 2014). A aplicação de duas doses intercaladas parece ser mais eficiente que elevar a dose, tanto em gado de leite (BRUSVEEN *et al.*, 2009) como de corte (WHITE *et al.*, 2016). Porém, Giordano *et al.* (2013) verificaram que o aumento da dose de cloprostenol de 500 mcg para 750 mcg em um protocolo OVSYNCH elevou as taxas de prenhez.

Outro aspecto importante no crescimento folicular e maturação final do folículo ovulatório em protocolos de IATF é o período sem ação da progesterona, ou seja, o proestro (DADARWAL *et al.*, 2013). Mussard *et al.* (2003; 2007) mostraram em uma série de experimentos que, apesar da importância do diâmetro do folículo ovulatório sobre a taxa de prenhez, o período entre a retirada da fonte de progesterona e a indução da ovulação é fundamental para a fertilidade. A diminuição na duração do protocolo de 7 para 5 dias com dispositivo de progesterona, e o aumento do intervalo entre a retirada do dispositivo e a indução da ovulação de 48-60 para 72 horas se mostrou eficiente em aumentar as taxas de prenhez (BRIDGES *et al.*, 2008). Essa mudança permite um maior crescimento do folículo ovulatório e conseqüentemente uma maior produção de estradiol. Bridges *et al.* (2010) mostraram em um estudo que, mesmo possuindo diâmetros foliculares iguais, folículos que submetidos a proestro curto (36 horas) produzem menores concentrações de estradiol que os que tiveram um proestro longo (54

horas). Em um estudo com transferência de embrião em vacas ovariectomizadas, Madsen *et al.* (2015) demonstraram a importância do estradiol sobre a manutenção da prenhez. Vacas que receberam estradiol no período periovulatório apresentaram maior chance de levar a gestação adiante. Outra implicação de um proestro longo é a maior produção de progesterona após a ovulação em relação ao proestro curto (BRIDGES *et al.*, 2010; MUSSARD *et al.*, 2007).

Ao final do protocolo, é necessário que haja o pico de LH para a indução da ovulação. Existem dois tipos de indutores da ovulação, os ésteres de estradiol, que são indutores indiretos de LH já que atuam no hipotálamo através de “feedback” positivo para liberação do pico de GnRH e consequentemente de LH, como o cipionato de estradiol e o benzoato de estradiol (SOUZA *et al.*, 2005). A outra classe de indutores são os hormônios análogos ao GnRH, que são indutores diretos do pico de LH, como a gonadorelina, busarelina e licerelina (PICARD-HANGEN *et al.*, 2015). A farmacocinética desses hormônios varia bastante, da mesma maneira que o pico de LH após sua aplicação (SOUZA *et al.*, 2005; STEEVENSON *et al.*, 2004; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015). Devido a isso ocorrem variações no momento de aplicação durante o protocolo, por exemplo, o CE é administrado concomitantemente com a remoção do dispositivo de progesterona (COLAZO *et al.*, 2003), o BE 24 horas após sua remoção do dispositivo (MARTINEZ *et al.*, 2004), e os análogos do GnRH de 16 horas antes ou simultaneamente com a IATF (PURSLEY *et al.*, 1997; MARTINEZ *et al.*, 2004).

Assim como as farmacocinéticas, a distribuição da ovulação destes indutores também apresenta padrão variado. A utilização de análogos do GnRH provoca um pico de LH duas horas após a aplicação (STEEVENSON *et al.*, 2004; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015) e a ovulação ocorre em um janela de 24 a 32 horas após o pico de LH (PURSLEY *et al.*, 1997). Trabalhos utilizando CE e BE possuem resultados bastante divergentes quanto a distribuição da ovulação, Uslenghi *et al.* (2014) afirmam que existe uma diferença da distribuição da ovulação entre os dois ésteres, o CE provoca ovulações mais distribuídas em relação ao BE, já para Torres-Júnior *et al.* (2012) essa variação não ocorre. Além disso, a utilização de CE pode provocar ovulações precoces, antes da IATF ou muito tardias, 90 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (COLAZO *et al.*, 2003; USLENGHI *et al.*, 2014). Essa discrepância entre a IA e a ovulação reduz drasticamente a taxa de fecundação (ROELOFS *et al.*, 2006), já que a

viabilidade do espermatozoide no trato reprodutivo varia entre 24 e 32 horas (HAWK, 1983).

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

ARTIGO À SER SUBMETIDO

**Ovulatory follicle diameter, estrus manifestation and pregnancy rates of beef heifers selected by corpus luteum presence at the beginning of TAI protocol using estradiol cypionate or GnRH as ovulation inductors**

**Silva E P<sup>1</sup>, Machado A B<sup>1</sup>, Gambin L S<sup>1</sup>, Silva M<sup>1</sup>, Klafke J M V<sup>1</sup>, Dias M M<sup>1</sup>,  
Chaiben M F C<sup>2</sup> & Borges J B S<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Unidade de reprodução de bovinos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brasil;

<sup>2</sup> Agener União Química

\* Autor para correspondência: joao.borges@ufrgs.br

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effect of presence of corpus luteum (CL) at the onset of timed AI (TAI) protocol in ovulatory follicle diameter, estrus expression and pregnancy rate using estradiol cypionate (EC) or GnRH as ovulation inductor in beef heifers. On day 0, heifers [n=414; 317±23 kg; 3.08±0.21 body condition score (1 to 5 scale) and 22-24 months of age] received a 1g progesterone (P4) intravaginal device (Primer®, Agener União, Brazil) and 2 mg of estradiol benzoate, IM,. On day 8, device was removed, heifers received 500 mcg of sodium cloprostenol, IM, and were divided in two groups: EC [n=213; 0.5mg EC, IM, on day 8] and GnRH [n=201; 25 mcg of Licerelin, IM, at TAI] TAI was performed 50 h after device removal. Heifers were tail painted to control estrus expression from device removal to TAI. On day 0 heifers were scanned to verify the presence of CL (with CL = 213, without CL = 202), on day 10 to measure the OFD and on day 11 to confirm ovulation. Heifers were also classified in 3 groups according OFD: small ( $\leq 9.5$  mm), medium (9.6-11.5 mm) and large ( $\geq 11.6$  mm) to verify its effect on estrus expression and pregnancy. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after TAI. Estrus expression was confirmed when marking ink was removed on day 10. Estrus expression was higher ( $P < 0.05$ ) in EC (93.90%, 200/213) compared to GnRH group (67.66%, 136/201). The OFD differed ( $P < 0.05$ ) according to presence of CL (10.3 mm) or not (9.6mm), but was similar in treatment groups. Ovulation rate did not differ in EC (85%, 17/20) and GnRH (95%, 19/20) groups. Pregnancy rates were similar ( $P > 0.05$ ) between EC (52.58%, 112/213) and GnRH

(59.20%, 119/201) groups, however, in heifers that expressed estrus was higher ( $P < 0.05$ ) (EC= 56%, 112/200; GnRH= 71.3%, 97/136) than in those that did not show (EC= 0%, 0/13; GnRH= 33.8%, 22/65). Presence of CL at onset of TAI protocol was associated with higher pregnancy ( $P < 0.05$ ) in GnRH group (68%, 68/100) compared with EC (54.46%, 61/112) group, but did not differ in heifers without CL (GnRH = 50.5%, 51/101; EC = 50.5%, 51/101). Medium and large OFD implicate in higher ( $P > 0.05$ ) estrus expression (EC= 100%, 51/51; 96.97%, 32/33; GnRH= 83.02%, 44/53; 97.44%, 38/39) than small OFD (EC= 85%, 51/60; GnRH= 23.8%, 15/63). Pregnancy was lower ( $P < 0.05$ ) in small OFD groups (EC= 28.3%, 17/60; GnRH= 25.4%, 16/63). In medium and large OFD pregnancy was similar in EC (72.55%, 37/51; 54.55%, 18/33) groups, but differed ( $P < 0.05$ ) between GnRH large (82.05%, 32/39) and medium (62.26%, 33/53). In conclusion, heifers with CL at the beginning of TAI protocol presented large OFD, and when treated with GnRH as ovulation inductor achieves higher pregnancy rates. Size of ovulatory follicle was associated with higher estrus behavior and pregnancy rates in EC and GnRH treatments.

### 3.1 INTRODUCTION

Timed artificial insemination (TAI) protocols provide to inseminate of all females in a predetermined time, reducing operational costs and labor time. In heifers, besides the adequate choice of a TAI protocol, another important point to achieve high pregnancy rates is animal selection before the beginning of the protocol. Heifers selected by presence of the corpus luteum (CL) at the beginning of TAI protocol had a higher pregnancy rate than those who did not have a CL (GUTIERREZ *et al.*, 2014). Higher pregnancy rate in cyclic animals is attributed to a probable regulation of the hypothalamic pituitary gonadal axis (BYERLEY *et al.*, 1987). Progesterone (P4) regulates this axis by increasing the number of GnRH receptors and the amount of LH stored in the pituitary gland for ovulation (ANDERSON *et al.*, 1996; HALL *et al.*, 1997). This determines greater size of the ovulatory follicle in the subsequent cycle, responsiveness to LH, luteal area and consequently better pregnancy rates (MANN and LAMMING, 2001).

There are several alternatives to induce ovulation in TAI protocols, such as estradiol esters (estradiol cypionate (EC) or estradiol benzoate (EB)) or GnRH analogues (AMBROSE *et al.*, 2005; USLENGHI *et al.*, 2014, PICARD-HANGEN *et*

*et al.*, 2015). These hormones have different pharmacokinetics in relation to plasma concentration and LH peak induction (STEVENSON *et al.*, 2004; PICARD-HANGEN *et al.*, 2015). Usually, in TAI protocols EC is used at time of P4 withdrawal, being an indirect inducer of LH release. GnRH, for being a direct inducer of LH, can be administered since 16 hours before or concomitantly with TAI (COLAZO *et al.*, 2014). Physiological proestrus is characterized by increased diameter and estradiol production of dominant follicle (PERRY *et al.*, 2007). In TAI protocols, this interval can be shortened in some animals, causing suboptimal growth conditions and ovulatory response of dominant follicle, and in several studies it has been shown to be positively related to fertility (BRIDGES *et al.*, 2008; DADARWAL *et al.*, 2013).

Other important factors to achieve success in TAI are OFD (PERRY *et al.*, 2007), estrus manifestation between the P4 device removal and TAI (SÁ FILHO *et al.*, 2011; BISHOP *et al.*, 2016) and ovulation distribution. CE causes more estrus manifestation and more widely ovulation distribution (USLENGHI *et al.*, 2014). On the other hand, GnRH provides better synchronous ovulatory window and lower estrus manifestation (PURSLEY *et al.*, 1995). Despite these differences both provide satisfactory pregnancy rates (PURSLEY *et al.*, 1995; USLENGUI *et al.*, 2014). However, ovulation inducers response in heifers according to their cyclicity status is not well elucidated. The objective of this study was to evaluate beef heifers reproductive performance selected by presence of CL at the beginning of TAI program, using EC or GnRH as ovulation inducers.

## **3.2 MATERIAL AND METHODS**

### **Local and animals**

This experiment was carried in four commercial farms on the state of Rio Grande do Sul, Brazil (29° S, 52° O). Experimental period was from November 2015 to February 2016. Experimental design and animals management were performed according to Ethical Committee on Animal Use recommendations, protocol number 31163, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. 414 Angus beef heifers (*Bos taurus*) were used, aged between 22 and 24 months, average live weight of  $317 \pm 23$  kg and average body condition score (BCS) of  $3.0 \pm 0.2$  (Scale from 1 to 5). Heifers were kept in native pastures with free access to water and mineral salt.



## **Treatments**

On day 0, all heifers received an intravaginal device with 1 g of P4 (Primer®, Agener Union, Brazil) and 2 mg of EB IM (RIC-BE®, Agener União, Brazil). On day 8, P4 device was removed and 500 mcg of sodium cloprostenol was administered, IM (ESTRON®, Agener Union, Brazil). Heifers were randomly divided into two groups according to ovulation inducer: EC [n = 213, 1 mg CE (SicroCP®, Ouro Fino, Brazil), IM, at device withdrawal] or GnRH [n = 201, 25 mcg of licerelin (GestranPlus®, Agener Union, Brazil), IM, at TAI (day 10)]. For estrus detection, heifers had their sacral region painted with estrous-appropriate paint (TELL TAIL®, GEA, New Zealand) at P4 device removal. Estrus manifestation was confirmed on day 10 (TAI), based on ink removal. TAI was performed 50 hours after P4 device was removed, using thawed semen from four bulls, according to location, with proven fertility according to Brazilian College of Artificial Insemination norms (CBRA, 1998).

## **Ultrasonographic exams**

On day 0 of protocol, heifers were examined by transrectal ultrasonography (7.5 MHz linear transducer, MediSono® P3V, USA) and classified according to observed ovarian structure (without CL = 202, with CL = 212). On day 10 (TAI), heifers were examined again to determine OFD (n = 299), which was defined by the mean diameter of two perpendicular measurements. Ovulatory follicles were divided into three classes according to diameter: class I ( $\leq 9.5$ mm), class II (9.6mm-11.5mm) and class III ( $\geq 11.6$ mm) to establish relation with estrus manifestation and pregnancy rate according to treatments. Ovulation rate was determined 36 hours after TAI in a subgroup of 40 animals defined by the disappearance of ovulatory follicle measured at TAI. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after TAI, being confirmed by the presence of fluid in the uterus and embryo with heart beating.

## **Estatistical analyzes**

Statistical analyzes were performed using SAS (Statistical Analysis System) version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Preliminary statistical model included treatment (EC and GnRH), absence / presence of CL, OFD, BCS, weight, location, inseminator and semen as random variables, all non-significant variables were removed from the model. Weight and OFD were analyzed by the MIXED procedure of SAS

using LSMEANS command to verify average per treatment. BCS variable and absence/presence of CL were analyzed by NPAR1WAY procedure and averages compared by the Wilcoxon test. Ovulation rate was analyzed by GLIMMIX procedure and evaluated by Fisher Exact test. The model to analyze estrus manifestation included OFD, treatment and absence / presence of CL, and was evaluated by the GLIMMIX procedure comparing averages by Fisher Exact test. The model for analysis of gestation diagnosis used the same variables as above, and included estrus manifestation, being analyzed at the same way. Significant difference was considered when P value was <0.05 and tendency when P value was <0.1.

### 3.3 RESULTS

#### **CL presence, ovulatory follicle diameter, estrus manifestation, pregnancy rates at 30 days after TAI between treatments.**

OFD, ovulation rate, estrus manifestation and pregnancy rate according to treatments are shown in Table 1. Estrus expression was higher in heifers treated with EC compared to those receiving GnRH, however pregnancy rate did not differ between heifers in both groups. In relation to estrus expression, OFD was similar between heifers treated with EC and GnRH that did not demonstrate estrus, however in those who showed estrus there was difference between treatments (Table 2). Pregnancy rates according to estrus manifestation and treatments differed between them (Table 2).

**Table 1.** CL presence, ovulatory follicle diameter, ovulation rate, estrus manifestation, pregnancy rate at 30 days after TAI according ovulation inducer (EC x GnRH).

Parameter	EC (n=213)	GnRH (n=201)	P-Value
CL (n)			
No CL	101a	101a	0,3545
With CL	112a	100a	
Ovulatory follicle diameter (mm)	9,97a (144/213)	9,98a (155/201)	0,9785
Ovulation rate, % (n/n)	85 (17/20)a	95 (19/20)a	0,3205
Estrus manifestation, % (n/n)	93,90 (200/213)a	67,66 (136/201)b	< 0,0001
Pregnancy rate, % (n/n)	52,58 (112/213)a	59,20 (119/201)b	0,1762

\* Means followed by distinct letters differed statistically (P <0.05).

**Table 2.** Ovulatory follicle diameter and pregnancy rate at 30 days after TAI according to estrus manifestation between ovulation inducers (EC x GnRH).

Parameter	No estrus		With estrus		P-Value
	EC	GnRH	EC	GnRH	
Ovulatory follicle diameter (mm), (n/n)	7,74a (9/13)	8,11a (58/65)	10,14b (135/200)	11,09c (97/136)	< 0,005
Pregnancy rate, % (n/n)	0% (0/13)a	33,85% (22/65)b	56% (112/200)c	71,32% (97/136)d	< 0,05

\*Means followed by distinct letters differed statistically (P <0.05).

### **Ovulatory follicle diameter, estrus manifestation and pregnancy rate at 30 days after TAI according to CL presence and treatments.**

OFD, estrus manifestation and pregnancy rate according to the presence of CL and treatments are shown in Table 3. Ovulatory follicle diameter was higher in heifers presenting CL at the beginning of TAI protocol. Estrus manifestation did not differ according to absence or presence of CL in the same treatment. TAI pregnancy rate was similar for heifers that did not have CL at the beginning of the protocol regardless of treatment, however in heifers with CL GnRH determine a higher pregnancy rate. Pregnancy rate of heifers with CL, regardless of the treatment, was 60.84% (129/212) and heifers without CL 50.5% (102/202) (data not analyzed due to treatment).

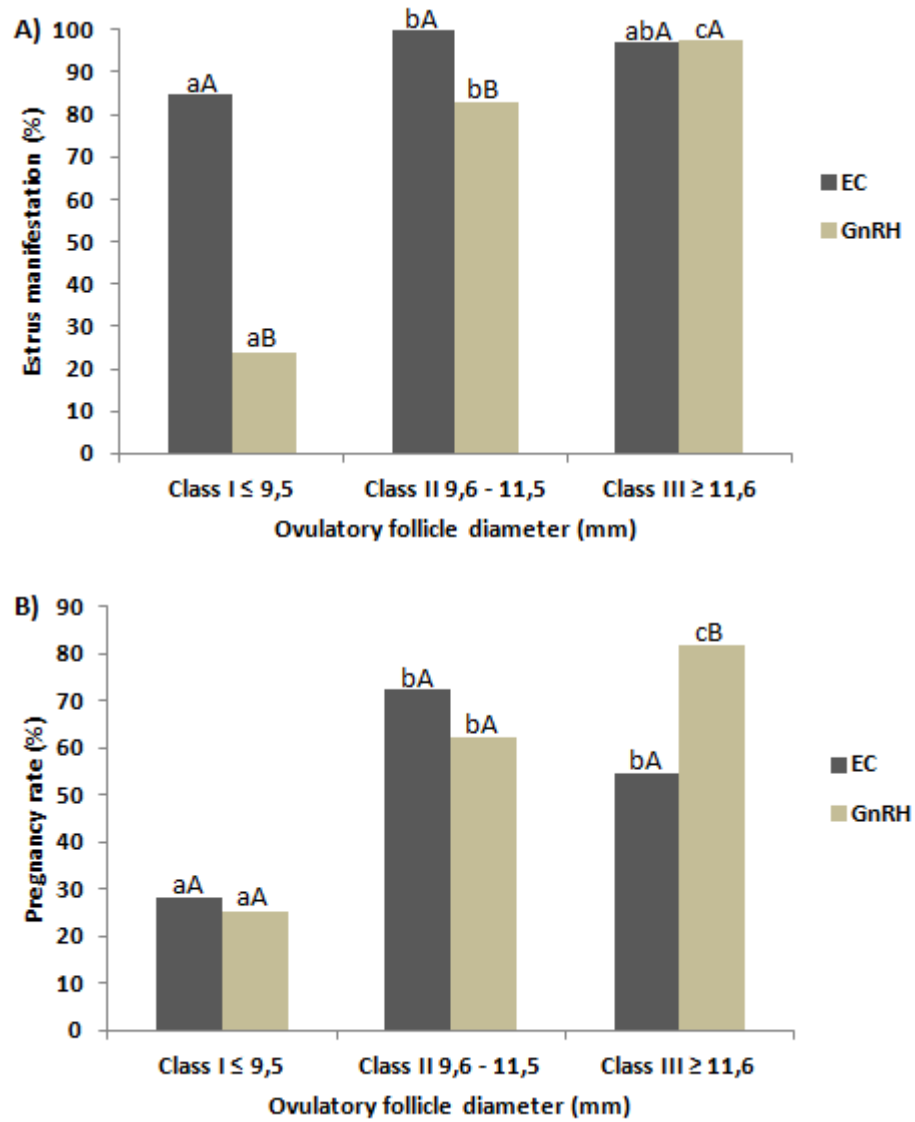
**Table 3.** Ovulatory follicle diameter, estrus manifestation and pregnancy rate at 30 days after TAI according to treatments and/or CL presence at the beginning of TAI protocol.

Parameter	No CL (n=202)	With CL (n=212)	P-Value
Ovulatory follicle diameter, mm	9,61a	10,34b	0,0058
Estrus manifestation, % (n/n)			
EC	93,06% (94/101)a	94,69% (107/112)a	< 0,0001
GnRH	63,36% (64/101)b	72% (72/100)b	
Pregnancy rate, % (n/n)			
EC	50,50% (51/101)c	54,46% (61/112)c	
GnRH	50,50% (51/101)c	68% (68/100)d	0,0460

\*Means followed by distinct letters differed statistically (P <0.05).

**Estrus manifestation and pregnancy rate at 30 days after TAI according ovulatory follicle diameter and treatment.**

Estrus manifestation in heifers treated with EC was high in all three classes of follicular diameter, and heifers treated with GnRH presented an increasing pattern according to follicular diameter class at TAI point being different among the three classes, as shown in Figure 1A. Comparing the same class among treatments, heifers treated with EC of classes I and II presented higher estrus manifestation when compared to heifers treated with GnRH of classes I and II, but in class III there was no difference between treatments. Pregnancy rate has a quadratic form in heifers treated with EC and it was higher for classes II and III, and in GnRH group, same distribution of estrus was present, being different among the three classes (Figure 1B). Comparing same classes between treatments, classes I and II did not differ between treatments, but class III GnRH treated heifers had a higher pregnancy rate than those treated with EC.



**Figure 1.** A) Estrus manifestation according to ovulatory follicle diameter classes and treatments (EC x GnRH). B) Pregnancy rate at 30 days after TAI according to OFD classes and treatments (EC x GnRH). Lowercase letters (a, b, c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between follicle classes in the same treatment. Uppercase letters (A, B, C) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between treatments in the same follicle class.

### 3.4 DISCUSSION

In the current experiment, pregnancy rate of beef heifers synchronized with EC or GnRH as ovulation inducers was similar, although estrus manifestation rate was different between treatments, OFD and ovulation rate did not differ either. However, considering CL presence as a selection tool, heifers treated with GnRH and with CL at the onset of synchronization protocol for TAI presented a higher pregnancy rate at 30 days (Table 3).

Gutierrez *et al.* (2014) subjected 2260 heifers to reproductive tract score (RTS, ANDERSON *et al.*, 1991) evaluation to initiate TAI program. Heifers with CL (RTS 5) presented pregnancy rate of 64.6%, while heifers without CL (RTS 1, 2, 3 and 4 added) presented 52.4% of pregnancy. These results agree with our data showing how animal selection at the onset of synchronization protocol for TAI is critical. GnRH-treated heifers with CL at the beginning of protocol had a higher pregnancy rate than those treated with EC (Table 3). P4 produced by CL regulates the hypothalamic pituitary gonadal axis, increasing the number of receptors for GnRH and the amount of LH stored in anterior pituitary (ANDERSON *et al.*, 1996; HALL *et al.*, 1997). In addition, the use of GnRH better synchronizes ovulation (PURSLEY *et al.*, 1997) compared to EC (USLENGHI *et al.*, 2014).

Estrus expression between P4 device removal and TAI point was an important factor to obtain high pregnancy rates (Table 2), which agrees with studies using GnRH (PERRY *et al.*, 2007) and estradiol esters (SÁ FILHO *et al.*, 2011). Estrous behavior occurs after serum estradiol concentration increasing, which controls several factors involved pregnancy establishment, including changes in follicular cells, oocytes, transport of gametes, and preparation of the uterus to pregnancy (POHLER *et al.*, 2012). The use of EC, as an steroid inducer, induces greater estrus manifestation than GnRH, which is a glycoprotein inducer (STEVENSON *et al.*, 2004; USLENGHI *et al.*, 2014; BISHOP *et al.*, 2016), according to Table 2. In the current experiment, it was found that GnRH-treated heifers that expressed estrus spontaneously presented high pregnancy rates (PERRY *et al.*, 2007), in relation to heifers treated with EC and demonstrating estrus (Table 2). In disagreement with Sá Filho *et al.* (2010) and Martins *et al.* (2014) we did not obtain high pregnancy rates in heifers treated with CE, probably because the percentage of females that showed estrus was higher in our study. No-estrus heifers had a lower pregnancy rate (Table 2), both using GnRH (PERRY *et al.*, 2007) and CE (MARTINS *et al.*, 2014) as ovulation inducers.

Correlated with estrus manifestation, a major factor contributing to TAI success was OFD (PERRY *et al.*, 2007; SÁ FILHO *et al.*, 2010). Heifers with CL at the beginning of protocol had larger follicles at TAI point (Table 3); probably by the increase of LH stored in the pituitary gland of cyclic females (ANDERSON *et al.*, 1996) increasing growth and ovulatory follicle size (PERRY *et al.*, 2007). Due to differences in oestrus manifestation between ovulation inducers, OFD varied between

heifers treated with EC or GnRH and showing estrus (Table 2). CE-treated heifers showed high estrus manifestation independent of follicular diameter (Figure 1A), different result from that found by Martins *et al.* (2014) in *Bos indicus* heifers. However, GnRH-treated heifers showed increased oestrus manifestation (Figure 1A) according to follicle size, since this is the only source of estradiol to induce estrus (JINKS *et al.*, 2013).

As ovulatory follicle size increases, pregnancy rate also increases (Figure 1B). Small follicles have lower estradiol production, which decreases estrus manifestation (PERRY *et al.*, 2007) and form smaller CL, decreasing P4 production, which reduces pregnancy rates (MANN AND LAMMING, 2001). Heifers treated with EC and having follicles between 9.6-11.5mm presented a benefit of this treatment, but it was not detected difference in pregnancy rate compared to those treated with GnRH, probably due the few number of animals (Figure 1B). Jinks *et al.* (2013) also found a beneficial effect of the use of EC on pregnancy rate of cows with follicles smaller than 12.2 mm. This modulation may occur due to increase in number of P4 receptors (ZELINSKI and STORMSHAK, 1981) and reduction of short oestrus cycles (KIEBORZ-LOOS *et al.*, 2003). In a recent study, Madsen *et al.* (2015) showed the importance of estradiol in the peri-ovulatory period on maintenance of pregnancy after transfer of embryos to ovariectomized cows. Cows receiving estradiol in peri-ovulatory period had a greater capacity to maintain gestation up to 29 days (MADSEN *et al.*, 2015).

Follicles greater than 12 mm have high ovulatory capacity (SARTORI *et al.*, 2001) and oocyte competence (ARLOTTO *et al.*, 1996), which is reflected in high pregnancy rates (PERRY *et al.*, 2007; SÁ FILHO *et al.*, 2010). In the current experiment, ovulation rate was high and similar between treatments (Table 1), agreeing with studies using estradiol esters (USLENGHI *et al.*, 2014; TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2014) and GnRH analogues (PERRY *et al.*, 2007). However, heifers with OFD greater than 11.5 mm had a higher pregnancy rate when treated with GnRH than with EC (Figure 1B). There is a difference in the magnitude and duration of LH peak after EC administration (STEVENSON *et al.*, 2004) when compared to GnRH (PICARD-HANGEN *et al.*, 2015), which alters the ovulation distribution, being more distributed in EC (USLENGHI *et al.*, 2014) than GnRH treated animals (PURSLEY *et al.*, 1995), altering pregnancy rate (ROELOFS *et al.*, 2006). Another possible explanation for this finding is that in this class 25% of follicles of heifers treated with EC had a diameter

greater than 15mm, which implies in a decrease in fertility (PERRY *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2014) associated with aged oocyte (MIHM *et al.*, 1999).

In conclusion, heifers selection by CL presence before the beginning of TAI protocol is fundamental to the success of this reproductive biotechnology. The use of EC induces a greater estrus manifestation even in females with small ovulatory follicles, and improves pregnancy rate in heifers with follicles between 9.6-11.5mm in diameter. The use of GnRH in heifers with CL at the beginning of TAI protocol determines higher pregnancy rate when compared to EC.

### 3.5 REFERENCES

AMBROSE, J. D.; KASTELIC, J. P.; RAJAMAHENDRAN, R.; AALI, M.; DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1457-1474, 2005.

ANDERSEN, K.J.; LEFEVER, D. G.; BRINKS, J. S.; ADDE, K. G.. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri Practice**, 1991.

ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1025-1031, 1996.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

BISHOP, B. E.; THOMAS, J. M.; ABEL, S. E.; POOCK, M. R.; ELLERSIECK, M. F.; SMITH, D.J. PATTERSON. Split-time artificial insemination in beef cattle: I. Using estrous response to determine the optimal time(s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. **Theriogenology**, 86:1102–1110, 2016.

BRIDGES, G. A., M. L. MUSSARD, C. R. BURKE, AND M. L. DAY. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal reproduction science**, v. 117, n. 3, p. 208-215, 2010.



BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, L. A.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L.. Decreasing the interval between GnRH and PGF 2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

BYERLEY D. J.; STAIGMILLER R. B.; BERARDINELLI J. G.; SHORT R.E. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 3, p. 645-650, 1987.

COLAZO M. G.; MAPLETOF R. J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 8, p. 772, 2014.

COLAZO, M.G., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49 p. 1998

DADARWAL D, MAPLETOFT RJ, ADAMS GP, PFEIFER LFM, CREELMAN C, SINGH J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 859-866, 2013.

GUTIERREZ K; KASIMANICKAM R; TIBARY A; GAY JM; KASTELIC JP; HALL JB, WHITTIER WD. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 918-924, 2014.

HALL JB, STAIGMILLER RB, SHORT RE, BELLOWS RA, MACNEIL MD, BELLOWS SE. Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 75, n. 6, p. 1606-1611, 1997.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of dairy science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.

JINKS, E. M., SMITH, M. F., ATKINS, J. A., POHLER, K. G., PERRY, G. A., MACNEIL, M. D., ... & GEARY, T. W. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1176-1185, 2013.

KIEBORZ-LOOS, K. R., GARVERICK, H. A., KEISLER, D. H., HAMILTON, S. A., SALFEN, B. E., YOUNGQUIST, R. S., & SMITH, M. F. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F in postpartum beef cows: Effects of progesterone and estradiol-17 $\beta$  treatment. **Journal of animal science**, v. 81, n. 7, p. 1830-1836, 2003.

MADSEN C A, PERRY GA, MOGCK CL, DALY RF, MACNEIL MD, GEARY TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Animal. reproduction. science**, 158:96-103, 2015.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.

MARTINS, T., PERES, R. F. G., RODRIGUES, A. D. P., POHLER, K. G., PEREIRA, M. H. C., DAY, M. L., & VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 81, n. 3, p. 446-453, 2014.

MIHM, M., CURRAN, N., HYTTEL, P., KNIGHT, P. G., BOLAND, M. P., ROCHE J. F. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 116, n. 2, p. 293-304, 1999.

MILLER B. G., MOORE, N. W., MURPHY, L., STONEGM. Early pregnancy in the ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival. **Australian journal of biological sciences**, v. 30, n. 4, p. 279-288, 1977.

PERRY, G. A., M. F. SMITH, A. J. ROBERTS, M. D. MACNEIL, AND T. W. GEARY. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 85, n. 3, p. 684-689, 2007.

PICARD-HAGEN N, LHERMIE G, FLORENTIN, S, MERLE D, FREIN P, GAYRARD V. Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177-183, 2015.

POHLER K .G., GEARY T. W., ATKINS J. A., PERRY G. A., JINKS E. M., SMITH M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 649-664, 2012.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2 $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

ROELOFS, J.B., GRAAT, E.A.M., MULLAART, E., SOEDE, N.M., VOSKAMP-HARKEMA, V., KEMP, B. Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2173-2181, 2006.

SÁ FILHO, M. F., A. M. CRESPILO, J. E. SANTOS, G. A. PERRY, AND P. S. BARUSELLI. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1, p. 23-30, 2010.

SÁ FILHO, M. F., SANTOS, J. E. P., FERREIRA, R. M., SALES, J. N. S., & BARUSELLI, P. S.. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

SARTORI, R., FRICKE, P. M., FERREIRA, J. C., GINTHER, O. J., & WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

STEVENSON, J. S.; TIFFANY, S. M.; LUCY, M. C. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3298-3305, 2004.

TORRES-JÚNIOR J. R. S., PENTEADO L., SALES J. N. S., SÁ FILHO M. F., AYRES H., BARUSELLI P. S.. 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. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 1, p. 9-14, 2014.

USLENGHI G, CHAVES SG, CABODEVILA J, CALLEJAS S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1, p. 1-7, 2014.

ZELINSKI, M. B.; STORMSHAK, F. Temporal relationships between endometrial RNA polymerase activities and steroid hormone receptors following estradiol administration during the midluteal phase of the ovine estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 24, n. 1, p. 119-124, 1981.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesta dissertação foram descritos os resultados obtidos através da seleção de novilhas de corte pela presença do CL antes do início do protocolo de IATF utilizando CE ou GnRH como indutores da ovulação.

A presença do CL no início do protocolo resultou em um folículo ovulatório maior ( $P < 0,05$ ) e em maiores taxas de prenhez quando comparado a novilhas que não possuíam CL no início do protocolo (60,84%, 129/212 x 50,50%, 102/202). A utilização de GnRH como indutor da ovulação promoveu maior taxa de prenhez ( $P < 0,05$ ) em novilhas com CL em relação ao CE (68%, 68/100; 54,46%, 61/112). Em novilhas sem CL não houve diferença do indutor sobre a taxa de prenhez.

Desta forma, a seleção de novilhas pela presença de CL antes de iniciar um protocolo de IATF e a indução síncrona da ovulação utilizando GnRH são fatores que podem aumentar a taxa de prenhez em novilhas submetidas a IATF.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU F. M., CRUPPE L. H., MAQUIVAR M., UTT M. D., MADSEN C. A., VASCONCELOS J. L. M., DAY M. L., GEARY T. W. Effect of follicle age on conception rate in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 92, n. 3, p. 1022-1028, 2014a.

ABREU F. M., GEARY T. W., CRUPPE L. H., MADSEN C. A., JINKS E. M., POHLER K. G., VASCONCELOS J. L. M., DAY M. L. The effect of follicle age on pregnancy rate in beef cows. **Journal of animal science**, v. 92, n. 3, p. 1015-1021, 2014b.

ADAMS, G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 54, p. 17-32, 1998.

AMBROSE, J. D., KASTELIC, J. P., RAJAMAHENDRAN, R., AALI, M., & DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1457-1474, 2005.

ANDERSEN K. J., LEFEVER D. G., BRINKS J. S., ADDE K. G. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri Practice**, 1991.

ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1025-1031, 1996.

ARAÚJO, R. R., GINTHER, O. J., FERREIRA, J. C., PALHAO, M. M., BEG, M. A., WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 426-437, 2009.

ARLOTTO, T., SCHWARTZ, J. L., FIRST, N. L., & LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

ARMSTRONG D. G., C. G. GUTIERREZ, G. BAXTER, A. L. GLAZYRIN, G. E. MANN, K. J. WOAD, C. O. HOGG, AND R. WEBB. Expression of mRNA encoding

IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**, v. 165, n. 1, p. 101-113, 2000.

AROSH, J.A.; BANU, S.K.; CHAPDELAINÉ, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v.145, p.2551–2560, 2004.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório INDEX ASBIA, 2014.

BAO, B., AND GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.

BARUSELLI, P.S.; HENDERSON, A.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2006. Anais. Londrina, p.113-132, 2006.

BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., GINTHER, O.J Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 120-126, 2002

BERFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 895-907, 1994

BISHOP, B. E., J.M. THOMAS, J.M. ABEL, S.E. POOCK, M.R. ELLERSIECK, M.F. SMITH, D.J. PATTERSON. Split-time artificial insemination in beef cattle: I. Using estrous response to determine the optimal time(s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. **Theriogenology**, 86:1102–1110, 2016.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3578-3587, 2010.

BLEACH, E. C., GLENCROSS, R. G., FEIST, S. A., GROOME, N. P., & KNIGHT, P. G. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and

steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 743-752, 2001.

BO G. A., ADAMS G. P., CACCIA, M., MARTINEZ M., PIERSON R. A., MAPLETOF, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995.

BO G. A., ADAMS G. P., PIERSON R. A., MAPLETOFT R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995.

BRIDGES, G. A., L. A. HELSER, D. E. GRUM, M. L. MUSSARD, C. L. GASSER, M. L. DAY. Decreasing the interval between GnRH and PGF 2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

BRIDGES, G. A., M. L. MUSSARD, C. R. BURKE, M. L. DAY. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal reproduction science**, v. 117, n. 3, p. 208-215, 2010.

BROWN, L. N., ODDE, K. G., KING, M. E., LEFEVER, D. G., & NEUBAUER, C. J. Comparison of melengestrol acetate-prostaglandin F 2  $\alpha$  to Syncro-Mate B for estrus synchronization in beef heifers. **Theriogenology**, v. 30, n. 1, p. 1-12, 1988.

BRUSVEEN, D. J.; SOUZA, A. H.; WILTBANK, M. C. Effects of additional prostaglandin F 2 $\alpha$  and estradiol-17 $\beta$  during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 4, p. 1412-1422, 2009.

BYERLEY D. J.; STAIGMILLER R. B.; BERARDINELLI J. G.; SHORT R. E. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 3, p. 645-650, 1987.

COLAZO M. G.; MAPLETOF R. J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 8, p. 772, 2014.

COLAZO, M.G., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-



based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

CUNHA A. P., GUENTHER J. N., MARONEY M. J., GIORDANO J. O., NASCIMENTO A. B., BAS S., AYRES H., WILTBANK M. C. Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. Suppl 1, p. 246, 2008

DADARWAL D., MAPLETOFT R. J., ADAMS G. P., PFEIFER L. F. M., CREELMAN C., SINGH J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 859-866, 2013.

DAY, M. L. State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. **Animal reproduction**, v. 12, p. 473-478, 2015.

DONALDSON, L.; HANSEL, W. Histological study of bovine corpora lutea. **Journal of dairy science**, v. 48, n. 7, p. 905-909, 1965.

ECHTERNKAMP, S. E., AND. HANSEL W. Concurrent changes in bovine plasma hormone levels prior to and during the first postpartum estrous cycle. **Journal of animal science**, v. 37, n. 6, p. 1362-1370, 1973.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GHANEM M.E., NAKAO T., NAKATANI K., AKITA M., SUZUKI T. Milk Progesterone Profile at and after Artificial Insemination in Repeat-Breeding Cows: Effects on Conception Rate and Embryonic Death. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 180-183, 2006.

GINTHER O.J., SILVA L.A., ARAUJO R.R., BEG M.A. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O. J., KOT, K., KULICK, L. J., & WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J.; BASHIR, S. T. Length of the luteal phase and frequency of the four permutations between two or three follicular waves and ipsilateral or contralateral locations of the corpus luteum and preovulatory follicle in heifers. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 114-119, 2013.

GINTHER, O.J. Internal regulation of physiological processes through local veno arterial pathways: a review. **Journal of animal science.**, v.39, n.3, p.550-564, 1974.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v.32, n.5, p.787-795, 1989.b

GINTHER, O.P.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.187-200, 1989.a

GIORDANO J.O., WILTBANK M. C., FRICKE P. M., BAS S., PAWLISCH R. A., GUENTHER J. N., NASCIMENTO A. B. Effect of increasing GnRH and PGF 2α dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 773-783, 2013.

GUTIERREZ K.; KASIMANICKAM R.; TIBARY A.; GAY J. M.; KASTELIC J. P.; HALL J. B., WHITTIER W. D. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 918-924, 2014.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproductive Cycles. In: **Reproduction in Farm Animals**. 7ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HALL J. B., STAIGMILLER R. B., SHORT R. E., BELLOWS R. A., MACNEIL M. D., BELLOWS S. E. Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 75, n. 6, p. 1606-1611, 1997.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of dairy science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.

HOLM, D. E.; THOMPSON, P. N.; IRONS, P. C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 87, n. 6, p. 1934-1940, 2009.

HUNTER R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 281-290, 2005.

IMAKAWA, K., DAY, M. L., ZALESKY, D. D., GARCIA-WINDER, M., KITTOK, R. J., & KINDER, J. E. Regulation of pulsatile LH secretion by ovarian steroids in the heifer. **Journal of animal science**, v. 63, n. 1, p. 162-168, 1986

JINKS, E. M., SMITH, M. F., ATKINS, J. A., POHLER, K. G., PERRY, G. A., MACNEIL, M. D., ... & GEARY, T. W. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1176-1185, 2013.

KIEBORZ-LOOS, K. R., GARVERICK, H. A., KEISLER, D. H., HAMILTON, S. A., SALFEN, B. E., YOUNGQUIST, R. S., & SMITH, M. F.. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F in postpartum beef cows: Effects of progesterone and estradiol-17 $\beta$  treatment. **Journal of animal science**, v. 81, n. 7, p. 1830-1836, 2003.

KINDAHL H, EDQVIST LE, GRANSTROM E, BANE A The release of prostaglandin F $2\alpha$  as reflected by 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F $2\alpha$  in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, p. 871-878, 1976.

KINDER, J. E., F. N. KOJIMA, E. G. M. BERGFELD, M. E. WEHRMAN, AND K. E. FIKE. 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. 1424-1440, 1996.

KOJIMA, F. N. The Estrous Cycle in Cattle: Physiology, Endocrinology, and Follicular Waves<sup>12</sup>. **The Professional Animal Scientist**, v. 19, n. 2, p. 83-95, 2003.

KOMAR, C. M., BERNDTSON, A. K., EVANS, A. C. O., & FORTUNE, J. E. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1797-1805, 2001.

KULICK, L. J., K. KOT, M. C. WILTBANK, AND O. J. GINTHER. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 913-921, 1999.

LAMB G. C., STEVENSON J. S., KESLER D. J., GARVERICK H. A., BROWN D. R. SALFEN B. E. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of animal science**, v. 79, n. 9, p. 2253-2259, 2001.

LAUDERDALE, J.W., B.E. SEGUIN, J.N. STELLFLUNG, J. R. CHENAULT, W.W. THATCHER, C.K. VINCENT, AND A. F. LOYANCANO. Fertility of Cattle Following PGF Injection. **Journal of animal science**, v. 38, n. 5, p. 964-967, 1974.

LUCY, M. C., H. J. BILLINGS, W. R. BUTLER, L. R. EHNES, M. J. FIELDS, D. J. KESLER, J. E. KINDER, R. C. MATTOS, R. E. SHORT, W. W. THATCHER, R. P. WETTEMANN, J. V. YELICH, AND H. D. HAFS. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 4, p. 982-995, 2001.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, n.2, p.301-307, 1987.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproductive Science**, v.42, p.307-320, 1996.

MADSEN C A, PERRY GA, MOGCK CL, DALY RF, MACNEIL MD, GEARY TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Animal. reproduction. science**, 158:96-103, 2015.

MAGALHÃES, D. M., FERNANDES, D. D., ARAUJO, V. R., ALMEIDA, A. P., MATOS, M. H. T., & FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 171-182, 2009.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.

MARTÍNEZ M. F., KASTELIC J. P., ADAMS G. P., COOK R. B., OLSON W. O., MAPLETOFT R. J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1049-1059, 2002.

MARTINEZ, M. F., ADAMS, G. P., KASTELIC, J. P., BERGFELT, D. R., & MAPLETOFT, R. J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, 2000.

MARTINS, J. P. N., POLICELLI, R. K., NEUDER, L. M., RAPHAEL, W., & PURSLEY, J. R. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F<sub>2α</sub> of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 6, p. 2815-2824, 2011.

MARTINS, T., PERES, R. F. G., RODRIGUES, A. D. P., POHLER, K. G., PEREIRA, M. H. C., DAY, M. L., & VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 81, n. 3, p. 446-453, 2014.

MIHM M, CURRAN N, HYTTEL P, KNIGHT PG, BOLAND MP, ROCHE JF. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 116, n. 2, p. 293-304, 1999.

MILLER B. G., MOORE N. W., MURPHY L., STONEGM. Early pregnancy in the ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival. **Australian journal of biological sciences**, v. 30, n. 4, p. 279-288, 1977.

MUSSARD M. L., BURKE C. R., BEHLKE E. J., GASSER C. L., DAY M. L. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **Journal of animal science**, v. 85, n. 4, p. 937-943, 2007.

MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: **Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology**,. p. 179-185, 2003.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYNSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, Baltimore, v.80, p.1-28, 2000.

PATTERSON, D. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F. A review of methods to synchronize estrus in replacement beef heifers and postpartum cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14\_suppl\_2, p. E166-E177, 2003.

PERRY, G. A., M. F. SMITH, A. J. ROBERTS, M. D. MACNEIL, AND T. W. GEARY. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 85, n. 3, p. 684-689, 2007.

PERRY, G. A., SMITH, M. F., LUCY, M. C., GREEN, J. A., PARKS, T. E., MACNEIL, M. D., GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

PICARD-HAGEN N, LHERMIE G, FLORENTIN, S, MERLE D, FREIN P, GAYRARD V. Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177-183, 2015.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193-1210, 2001.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

POHLER K .G., GEARY T. W., ATKINS J. A., PERRY G. A., JINKS E. M., SMITH M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 649-664, 2012.

PURSLEY, J. R., WILTBANK, M. C., STEVENSON, J. S., OTTOBRE, J. S., GARVERICK, H. A., ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 295-300, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2 $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RIVERA F. A, MENDONCA L. G. D., LOPES G., SANTOS J. E. P., PEREZ R. V., AMSTALDEN M., CORREA-CALDERON A., CHEBEL R. C. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 141, n. 3, p. 333-342, 2011.

ROBINSON, R. S., MANN, G. E., LAMMING, G. E., & WATHES, D. C. 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.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, p.19-27, 1996.

ROELOFS, J.B., GRAAT, E.A.M., MULLAART, E., SOEDE, N.M., VOSKAMP-HARKEMA, V., KEMP, B. Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2173-2181, 2006.

SÁ FILHO, M. F., A. M. CRESPILO, J. E. SANTOS, G. A. PERRY, P. S. BARUSELLI. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with

progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1, p. 23-30, 2010.

SÁ FILHO, M. F., SANTOS, J. E. P., FERREIRA, R. M., SALES, J. N. S., BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

SANTOS, J. T., FERREIRA, R., GASPERIN, B. G., SIQUEIRA, L. C., DE OLIVEIRA, J. F., SANTOS, R. A., & GONÇALVES, P. B. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 13, n. 1, p. 91-98, 2012.

SARTORI, R., FRICKE, P. M., FERREIRA, J. C., GINTHER, O. J., & WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SEGUIN, B.E., B.K. GUSTAFSON, J..P. HURTGEN, E.C. MATHER, K.R. REFSAL, R.A. WESCOTT, AND H. L. WITHMORE. Use of the prostaglandin F<sub>2α</sub> analog cloprostenol (ICI 80, 996) in dairy cattle with unobserved estrus. **Theriogenology**, v. 10, n. 1, p. 55-64, 1978.

SEIDEL G.E. JR. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. **Proc. Beef Improvement Federation**. Sheridan, WY. 28-39, 1995.

SENGER, P. L. Puberty. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Pullman: Current Conceptions, Inc. pp, p. 128-42, 2005.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A. Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 1, p. 127-131, 1971.

SILVIA W. J., LEWIS G. S., MCCRACKEN J. A., THATCHER W. W., WILSON L. JR. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> during luteolysis in ruminants. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 5, p. 655-663, 1991.



SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SOUZA, A. H., CUNHA, A. P., CARAVIELLO, D. Z., & WILTBANK, M. C. Profiles of circulating estradiol-17 $\beta$  after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Anim. Reprod.**, v. 2, n. 4, p. 224-232, 2005.

SOUZA, A. H., GÜMEN, A., SILVA, E. P. B., CUNHA, A. P., GUENTHER, J. N., PETO, C. M., WILTBANK, M. C. Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 10, p. 4623-4634, 2007.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.*, v.53, p.1527-1543, 1995.

STEVENSON, J. S.; TIFFANY, S. M.; LUCY, M. C. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3298-3305, 2004.

THATCHER W. W., GUZELOGLU A., MATTOS R., BINELLI M., HANSEN T. R., PRU J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.

TORRES-JÚNIOR J. R. S., PENTEADO L., SALES J. N. S., SÁ FILHO M. F., AYRES H., BARUSELLI P. S. 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. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 1, p. 9-14, 2014.

TOWNSON, D. H., TSANG, P. C. W., BUTLER, W. R., FRAJBLAT, M., GRIEL, L. C., JOHNSON, C. J., PATE, J. L. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of animal science**, v. 80, n. 4, p. 1053-1058, 2002.

USLENGHI G, CHAVES S. G., CABODEVILA J., CALLEJAS S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1, p. 1-7, 2014.

WALDMANN A., REKSEN O., LANDSVERK K., KOMMISRUDE E., DAHL E., REFSDAL A., ROPSTAD E. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination—effects on non-return and repeat-breeding. **Animal reproduction science**, v. 65, n. 1, p. 33-41, 2001.

WATHES, D. C.; HAMON, M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. **Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 479-NP, 1993.

WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, p. 53-67, 1994.

WEBB, R. P. C. G., GARNSWORTHY, P. C., GONG, J. G., ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13\_suppl, p. E63-E74, 2004.

WEBB, R., GOSDEN, R., TELFER, E., MOOR, R. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science (United Kingdom)**, 1999.

WHITE S. S., KASIMANICKAM R. K., KASIMANICKAM V. R. Fertility after two doses of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  concurrently or at 6-hour interval on the day of CIDR removal in 5-day CO-Synch progesterone-based synchronization protocols in beef heifers. **Theriogenology**, 84: 785-790, 2016.

WILTBANK M. C., SOUZA A. H., CARVAHLO P. A., CUNHA A. P., GIORDANO J. O., FRICKE P. M., BAEZ G. M., DISKIN M. G. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 70-81, 2014.

WILTBANK M.C., SOUZA A.H., GIORDANO J.O., NASCIMENTO A.B., VASCONCELOS J.M., PEREIRA M.H.C., FRICKE P.M., SURJUS R.S., ZINSLY F.C.S., CARVALHO P.D., BENDER R.W., SARTORI R. Positive and negative effects

of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal reproduction**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2012.

ZELINSKI, M. B.; STORMSHAK, F. Temporal relationships between endometrial RNA polymerase activities and steroid hormone receptors following estradiol administration during the midluteal phase of the ovine estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 24, n. 1, p. 119-124, 1981.