

Eficácia da associação dupla dose PGF2 alfa-eCG no proestro de vacas leiteiras mestiças submetidas à IATF¹

Alexandra S. Rodrigues^{2*}, Mariana A.A. Silva³, Tiago O. Brandão³,
Aloísio B. Nascimento³, Rodrigo F. Bittencourt³, Marcos Chalhoub³,
Thereza C.B.S.C. Bittencourt³ e Antonio de L. Ribeiro Filho³

ABSTRACT.- Rodrigues A.S., Silva M.A.A., Brandão T.O., Nascimento A.B., Bittencourt R.F., Chalhoub M., Bittencourt T.C.B.S.C. & Ribeiro Filho A.L. 2018. [Efficacy of the double PGF2 alpha dose-eCG association in proestrus of crossbred dairy cows submitted to IATF.] Eficácia da associação dupla dose PGF2 alfa-eCG no proestro de vacas leiteiras mestiças submetidas à IATF. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(8):1518-1527. Centro Multidisciplinar Campus Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Avenida 23 de Agosto 860, Centro, Barra, BA 47100-000, Brazil. E-mail: alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

The study aimed to evaluate the effect of one or two prostaglandin doses F2 α (PGF2 α) with or without equine chorionic gonadotropin (eCG) in the follicular dynamics, the preovulatory luteal function, as well as the structural and functional characteristics post-ovulatory of the corpus luteum (CL) in cyclic crossbred females subjected to a fixed time artificial insemination (FTAI) protocol. For this, 29 multiparous 3/4 Gyr x Holstein cows were subjected to transrectal ultrasound examination (US) and upon detection of CL initiated a FTAI protocol on day called zero (D0) by the insertion of progesterone implant (P4) associated with the application of 2.0mg estradiol benzoate. On D7, these animals received 12.5mg of dinoprost tromethamine. At D9 happened the removal of the P4 devices and was applied 0.6mg of estradiol cypionate. At that time, the females were divided into the following treatments: control group (n=7) - which received 2.5mL of saline solution, 2PGF group (n=7) - received 12.5mg of dinoprost tromethamine, eCG group (n=7) - was administered 300IU eCG and eCG+2PGF group (n=8) - which received 300 IU eCG and 12.5mg of dinoprost tromethamine. To assess follicular dynamics were performed US scans B-mode and power doppler (Mindray Z5, Shenzhen, China) each 12h on D7 until the time of ovulation or until 96h after removal of the P4 implants, considering the follicular diameter (DFOL), the area of the follicular wall (AFOL) and the blood perfusion area of the follicular wall (VFOL). Concomitant with each test, blood samples were collected to determine the serum concentration of P4 preovulatory by chemiluminescence methodology. In D24 had held US B-mode and doppler to analyse the luteal diameter (DCL), luteal area (ACL) and blood perfusion area CL (VCL). Also, a blood sample was collected to determine the serum concentration of P4 post-ovulatory. All data was evaluated by Two-way ANOVA and repeated measures analysis considering the effects of eCG, 2PGF and eCG*2PGF, P<0.05. There was not significant difference between the synchronization protocols for DFOL, AFOL and VFOL variables over time of follicular dynamics. Experimental groups had a serum concentration of P4 preovulatory similar in every moment of evaluation. There wasn't distinction of ACL and VCL between hormone treatments. However, the eCG group showed a tendency (P=0.08) to present higher DCL compared to the 2PGF and 2PGF+eCG groups. In addition to these findings, there was also a tendency (P=0.07) to higher concentrations of P4 on D24 of the protocol in the animals of the eCG group (11.00 \pm 3.32ng/mL) compared to the 2PGF group (6,37 \pm 1.31ng/mL), meanwhile

¹ Recebido em 19 de julho de 2017.

Aceito para publicação em 28 de setembro de 2017.

² Centro Multidisciplinar Campus Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Avenida 23 de Agosto 860, Centro, Barra, BA 47100-000, Brasil.

³ Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. *Autor para correspondência: alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

the Control and 2PGF+eCG showed intermediate results that resembled both groups, with concentrations of 8.43 ± 3.85 and 9.18 ± 2.82 ng/mL, respectively. Attempts to adjust proestrus were unable to improve follicular quality and minimize preovulatory luteal function, nor did they increase CL morphology and post-ovulatory luteal function, suggesting that in cyclic animals, FTAI protocols using a single PGF2 α dose and without the gonadotrophic support of eCG seems to promote adequate follicular and luteal responses.

INDEX TERMS: Cattle, equine chorionic gonadotropin, luteolysis, synchronization protocol, clinics.

RESUMO.- Objetivou-se avaliar o efeito de uma ou duas doses de prostaglandina F2 α (PGF2 α) associada ou não a gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre a dinâmica folicular, a função luteal pré-ovulatória, assim como as características morfofuncionais pós-ovulatórias do corpo lúteo (CL) em fêmeas mestiças cíclicas submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para tanto, 29 vacas 3/4 Gir x Holandês múltiparas foram submetidas ao exame de ultrassonografia (US) transretal e após a detecção do CL iniciou-se um protocolo de IATF em um dia denominado zero (D0), por meio da inserção do implante de progesterona (P4) associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol. No D7 esses animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina. No D9 realizou a remoção dos dispositivos de P4 e aplicou 0,6mg de cipionato de estradiol. Nesse momento, as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle (n=7), foi administrado 2,5mL de solução fisiológica; Grupo 2PGF (n=7), aplicou 12,5mg de dinoprost trometamina; Grupo eCG (n=7), administrou-se 300UI de eCG; Grupo 2PGF+eCG (n=8), realizou a aplicação de 300UI de eCG e 12,5mg de dinoprost trometamina. Para avaliar a dinâmica folicular foram realizados exames de US em modo B e *power doppler* (Mindray Z5, Shenzhen, China) a cada 12h do D7 até o momento da ovulação ou 96h após a remoção dos implantes de P4, mensurando-se o diâmetro folicular (DFOL), a área da parede folicular (AFOL) e a área de perfusão sanguínea da parede folicular (VFOL). Concomitante a cada exame, foram coletadas amostras de sangue sendo determinada a concentração sérica de P4 pré-ovulatória por meio da metodologia de quimioluminescência. No D24 foi realizada a US modo B e *doppler* analisando-se o diâmetro luteal (DCL), área luteal (ACL) e área de perfusão sanguínea do CL (VCL), assim como, foi coletada amostra de sangue para averiguar a concentração sérica de P4 pós-ovulatória. Os dados foram avaliados pelo Two-way ANOVA e análise de medidas repetidas considerando os efeitos do eCG, 2PGF e interação eCG*2PGF, $P < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os protocolos de sincronização para as variáveis DFOL, AFOL e VFOL ao longo do tempo da dinâmica folicular. Os grupos experimentais apresentaram uma concentração sérica de P4 pré-ovulatória semelhante em cada momento da avaliação. Não foi observada distinção da ACL e VCL entre os tratamentos hormonais, contudo o Grupo eCG demonstrou tendência ($P=0,08$) a apresentar maior DCL em relação ao Grupo 2PGF e 2PGF+eCG. Adicionalmente a estes achados, também foi constatado tendência ($P=0,07$) a maiores concentrações de progesterona no dia 24 do protocolo nos animais do Grupo eCG ($11,00 \pm 3,32$ ng/mL) em relação ao Grupo 2PGF ($6,37 \pm 1,31$ ng/mL), enquanto o Controle e 2PGF+eCG demonstraram resultados intermediários que se assemelham a ambos os grupos, com concentrações de

$8,43 \pm 3,85$ e $9,18 \pm 2,82$ ng/mL, respectivamente. As tentativas de ajustes no proestro foram incapazes de melhorar a qualidade folicular e minimizar a função luteal pré-ovulatória, assim como não incrementaram a morfologia do CL e a função luteal pós-ovulatória, sugerindo que em animais cíclicos mestiços protocolos de IATF com a utilização de uma única dose PGF2 α e sem o suporte gonadotrófico da eCG parece promover adequada resposta folicular e luteal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovinos, gonadotrofina coriônica equina, luteólise, protocolo de sincronização, clínica.

INTRODUÇÃO

A incorporação de programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) vem se destacando em rebanhos comerciais, por permitir a superação dos históricos entraves de acurácia na detecção de estro e anestro pós-parto característico de rebanhos mestiços criados a pasto no Brasil (Baruselli et al. 2012, Wiltbank & Pursley 2014). Os protocolos de IATF mais utilizados em países da América do Sul se baseiam no controle da emergência folicular e da ovulação por meio da associação entre progestágenos e benzoato de estradiol, seguida da retirada dos dispositivos de progesterona e tratamento com fármacos luteolíticos que permitem um término sincronizado da fase luteínica e, finalmente, a aplicação de ésteres de estradiol que constituem os agentes mais empregados na indução do estro e da ovulação (Cavalieri et al. 2006, Sartori et al. 2010, Binelli et al. 2014a).

Apesar da evolução alcançada pelas modernas técnicas de sincronização, os resultados obtidos em rebanhos leiteiros ainda podem ser incrementados, pois os índices de fertilidade variam entre 35 a 55% (Bó et al. 2013). Uma alternativa para melhorar este quadro, encontra-se na inserção de pequenos ajustes nos protocolos de IATF (Wiltbank et al. 2014). Nos últimos anos, tem se verificado um crescente interesse nos estudos a respeito da manipulação final dos protocolos para gerar um perfil endócrino ideal no proestro com níveis mínimos de progesterona concomitante a elevação das concentrações de estrógeno produzidas pelo folículo dominante e consequente ovulação. Entre as várias propostas pode-se destacar a realização de uma luteólise completa, proporcionando um declínio uniforme da progesterona em conjunto com um *priming* de estrógeno fornecido pelo suporte gonadotrófico por meio do tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Binelli et al. 2014b).

A eCG é um fármaco que se liga a receptores de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) do folículo e a receptores de LH no corpo lúteo (CL), aumentando o diâmetro e a capacidade esteroidogênica destes (Murphy 2012). Segundo Núñez-Olivera et al. (2014), quando utilizado em protocolos de sincronização, a eCG estimulou o crescimento

folicular, que por sua vez aumentou a taxa de ovulação, o diâmetro do CL e a concentração sérica de progesterona após a inseminação e estes efeitos parecem ser mais acirrados em vacas leiteiras comerciais criadas a pasto (Souza et al. 2009, Garcia-Ispierto et al. 2012, Rensis & López-Gatius 2014).

Seguindo outra linha de pesquisa, uma luteólise mais eficiente pode exercer efeito positivo sobre os resultados dos protocolos de IATF (Wiltbank et al. 2014). Pereira et al. (2013b) demonstraram que baixas concentrações de progesterona próxima à fertilização parece ser essencial em protocolos a base de progesterona e estrógeno, segundo esses autores, vacas com concentrações de progesterona acima de 0,09ng/mL neste período tiveram um comprometimento da fertilidade. Corroborando com esse estudo, Pereira et al. (2015) verificaram melhores índices de concepção em vacas Holandesas de alta produção cíclicas e acíclicas por meio do uso de duas doses de prostaglandina F₂α (PGF₂α). Entretanto, Brusveen et al. (2009) e López-Gatius et al. (2015) demonstraram em programas de sincronização a base de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) em vacas leiteiras que o aumento do número de administrações de PGF₂α não promoveu efeito sobre a fertilidade, apesar de ter obtido uma melhor regressão luteal alcançando níveis de progesterona abaixo de 0,4ng/mL no momento da IATF.

Embora alguns autores sugerirem que a adição de uma dose de PGF₂α promoveu um ambiente uterino mais adequado para a sobrevivência dos gametas e a ocorrência da fertilização (Giordano et al. 2013, Pereira et al. 2015), os resultados controversos supracitados e a ausência de estudos abordando o efeito da dupla dose de um luteolítico concomitante ou não ao uso da eCG sobre a dinâmica folicular e função luteal pré e pós-ovulatória, tornam ainda não totalmente elucidado o seu mecanismo de ação sobre a fisiologia reprodutiva do proestro (Wiltbank et al. 2014).

Deste modo, objetivou-se avaliar o efeito de uma ou duas doses de PGF₂α associada ou não a eCG sobre a dinâmica folicular, a função luteal pré-ovulatória, assim como as características morfofuncionais pós-ovulatórias do corpo lúteo (CL) em fêmeas mestiças cíclicas submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais. O experimento foi realizado entre maio de 2015 e janeiro de 2016 na Fazenda Experimental de Entre Rios da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA), localizada no município de Entre Rios região Nordeste da Bahia, com latitude 11°56'31" sul, longitude 38°05'04" oeste e estando a uma altitude de 162 metros. A região apresenta pluviosidade média anual de 1.251mm e possui clima do tipo subtropical úmido. A propriedade adotava um sistema extensivo de criação de animais em pastagem predominantemente de *Bachiaria decumbens*, com suplementação mineral e água ad libitum.

Foram utilizadas 29 fêmeas mestiças 3/4 Gir x Holandês, não lactantes à cerca de 30 dias, pertencentes à categoria plurípara, idade média de 5,69±1,06 anos, com escore de condição corporal (ECC) de 3,01±0,39 avaliado utilizando-se a escala de 1 a 5 (Houghton et al. 1990).

Previamente ao início da sincronização, os animais foram submetidos a um exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China), sendo consideradas aptas a

participarem do experimento, fêmeas que apresentaram no momento da avaliação ausência de anormalidades no trato reprodutivo.

Todos os animais usados no experimento dessa propriedade foram vacinados contra doenças da esfera reprodutiva e obedeciam ao calendário oficial estadual de vacinação. As fêmeas foram manipuladas em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais institucional (CEUA-EMEVZ/UFBA, nº052/2015).

Protocolos de sincronização. As vacas foram submetidas a um protocolo de pré-sincronização da onda folicular e da ovulação iniciado em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 18 (D-18) por meio da inserção de um dispositivo intravaginal de primeiro uso contendo 1,0g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brasil), associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular (im). No dia menos nove (D-9) realizou-se a remoção dos implantes de progesterona e estes animais foram tratados com 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im, 300UI de eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im e 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im. No dia zero (D0) do protocolo de pré-sincronização foi realizada uma avaliação ultrassonográfica transretal utilizando-se um transdutor linear com frequência de 6,0MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China), sendo inseridas no protocolo de sincronização apenas vacas com presença de um CL≥1,5cm, os quais segundo Leal et al. (2009) apresentam-se funcionalmente mais ativos.

O protocolo de sincronização começou imediatamente após a identificação da estrutura luteal no D0, por meio da inserção de um dispositivo intravaginal de primeiro uso contendo 1,0g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino, São Paulo, Brasil), associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, São Paulo, Brasil) im. No dia sete (D7) esses animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im. No dia nove (D9) foi realizada a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona e se aplicou 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im, neste momento, as fêmeas foram subdivididas nos seguintes tratamentos: Grupo Controle (n=7), foi administrado 2,5mL de solução fisiológica im; Grupo 2PGF (n=7), aplicou-se 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im; Grupo eCG (n=7), administrou-se 300UI de eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im; Grupo 2PGF+eCG (n=8), foi realizado a aplicação de 300UI de eCG im e 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) im (Fig.1). Os animais não foram submetidos à inseminação artificial, sendo realizada a avaliação das características ultrassonográficas e perfil hormonal nos distintos protocolos.

Avaliações ultrassonográficas. Os exames ultrassonográficos foram realizados utilizando um aparelho portátil equipado com as funções modo B e doppler (Mindray Z5, Shenzhen, China), para as avaliações em modo B empregou-se um transdutor transretal com frequência de 7,5Mhz. No modo doppler as configurações foram ajustadas para detectar movimento das células sanguíneas em pequenos vasos, para este efeito utilizou-se modo *power-flow*, uma frequência de 4,2Mhz, com padrões de ganho de cor de 58%, frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,6KHz e a profundidade de avaliação de 6cm.

Dinâmica folicular. O desenvolvimento folicular foi monitorado por avaliações ultrassonográficas modo B e doppler realizadas a cada 12 horas entre o dia sete do protocolo e o momento da ovulação, naqueles animais que não se detectou a ovulação, essa análise aconteceu até 96 horas após a remoção do implante (Fig.1). Os ovários foram localizados e avaliados por ultrassonografia em modo B e a imagem

dos dois maiores folículos foram congeladas para determinação do diâmetro do folículo dominante no dia sete (DFOL7), no dia nove (DFOL9) e no dia 11 (DFOL11) do protocolo de sincronização. Para verificar o diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL) mensurou-se a imagem do maior folículo previamente ao seu desaparecimento em decorrência a ovulação. O diâmetro folicular foi determinado por meio da média aritmética entre duas mensurações na seção transversal do maior diâmetro folicular e o diâmetro perpendicular a este (Fig.2). A taxa de crescimento do folículo ovulatório (TXFOL) foi obtida pela diferença entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL) e o diâmetro do maior folículo na primeira avaliação no dia

sete (FOLD7) dividido pelo período de crescimento e expresso na unidade de centímetros por dia (cm/d). Também se empregou a ultrassonografia modo B para mensuração da área total da parede do folículo dominante no dia sete (AFOLD7), no dia nove (AFOLD9) e no dia 11 (AFOLD11) do protocolo de sincronização, assim como no momento em que identificou-se o folículo pré-ovulatório calculou-se a área total da parede do folículo pré-ovulatório (AFOL). A ovulação foi definida pelo desaparecimento do folículo pré-ovulatório presente no exame anterior com consequente formação de CL.

As imagens dos folículos foram armazenadas também com recurso doppler ativado para quantificar a área de perfusão sanguínea da parede

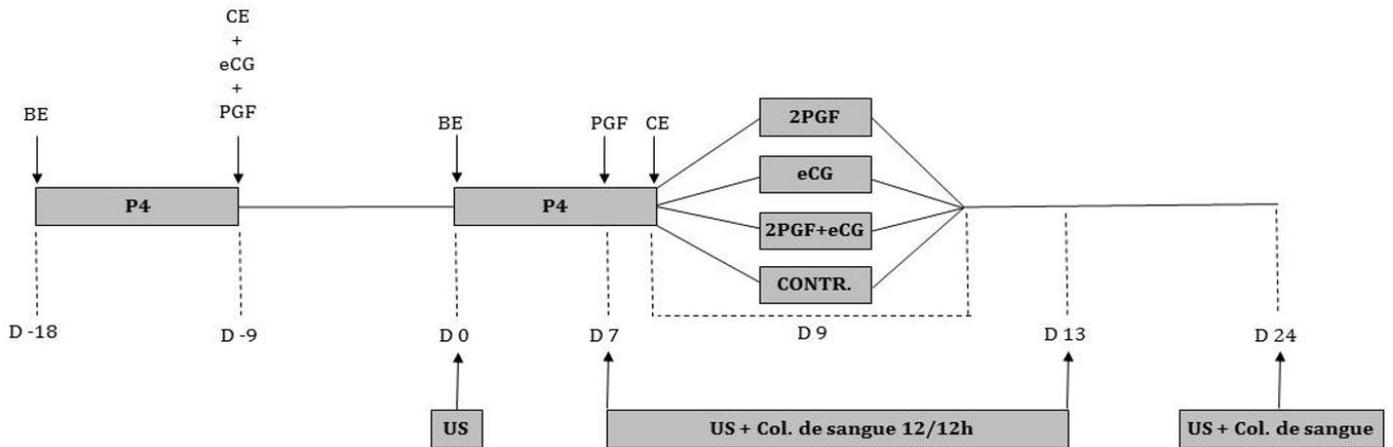


Fig.1. Diagrama de atividades realizadas ao longo dos protocolos de sincronização, objetivando avaliar a dinâmica folicular, função luteal pré-ovulatória e característica morfofuncional pós-ovulatória do corpo lúteo. P4 = implantes intravaginais contendo 1,0g de progesterona, BE = 2mg de benzoato de estradiol, CE = 0,6mg de cipionato de estradiol, eCG = 300UI de gonadotrofina coriônica equina, PGF = Prostaglandina F $_{2\alpha}$ (12,5mg de dinoprost trometamina). Grupo 2PGF = Prostaglandina F $_{2\alpha}$ (12,5mg de dinoprost trometamina) no D9; Grupo eCG = 300UI de gonadotrofina coriônica equina no D9; Grupo 2PGF+eCG = prostaglandina F $_{2\alpha}$ (12,5mg de dinoprost trometamina) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina no D9; Grupo Controle = 2,5mL de solução fisiológica no D9. US = ultrassonografia transretal; Col. de sangue = coleta de sangue para dosagem da concentração sérica de progesterona.

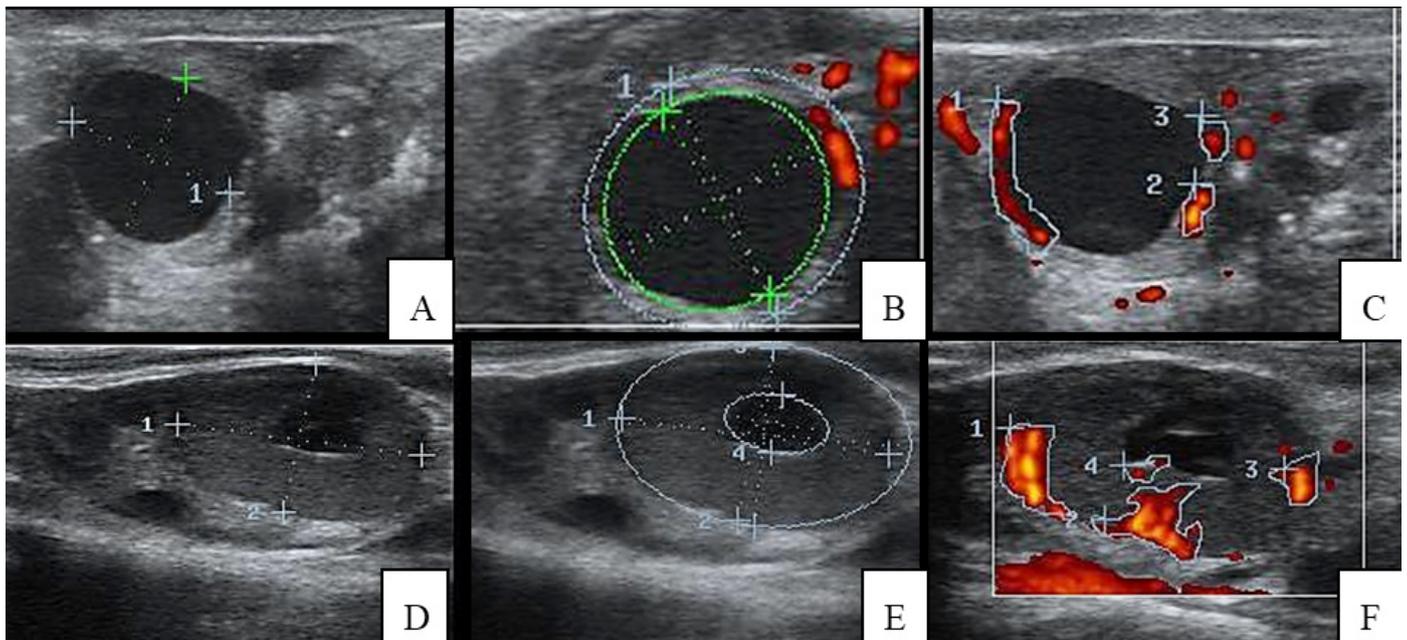


Fig.2. Mensuração do diâmetro folicular (A), área total da parede folicular (B), área de perfusão sanguínea na parede do folículo, diâmetro do corpo lúteo (D), área total do corpo lúteo (E) e área de perfusão sanguínea do corpo lúteo (F).

do folículo dominante no dia sete (VFOLD7), no dia nove (VFOLD9), no dia 11 (VFOLD11) do programa de IATF, assim como, a área de perfusão sanguínea da parede do folículo pré-ovulatório (VFOL).

Os dados obtidos pela ultrassonografia modo B e *power doppler* foram salvos, sendo posteriormente submetidos as avaliações objetivas segundo Ghetti (2012), para tanto, calculou-se a área total da parede do folículo utilizando o cursor do aparelho para indicar a toda a área circunferência externa folicular a qual foi subtraída da área circunferência interna da cavidade folicular. Posteriormente, fez-se o cálculo da área de perfusão sanguínea empregando o cursor para se determinar a área de perfusão sanguínea na parede do folículo (Fig.2). Ambas as avaliações foram feitas utilizando a mesma imagem.

Mensuração do CL. O CL foi avaliado por ultrassonografia modo B e *power doppler* no dia 24 (D24) do protocolo de sincronização, ou seja, 15 dias após a retirada dos dispositivos de progesterona (Fig.1). Após a localização do ovário, o mesmo foi analisado por ultrassonografia em modo B e a imagem do CL foi congelada para mensuração do diâmetro (DCL) e da área total (ACL) do CL. A imagem luteal foi gravada também com recurso doppler ativado para mensuração da área de perfusão sanguínea do CL (VCL).

O diâmetro do CL foi determinado por meio da média aritmética entre duas mensurações na secção transversal do maior diâmetro luteal e o diâmetro perpendicular a este (Fig.2). As imagens luteais foram salvas, sendo posteriormente submetidas as avaliações objetivas de acordo com Arêas (2012), onde calculou-se a área total do CL empregando o cursor do aparelho para indicar toda a área do perímetro do CL, e para determinar a área de tecido luteal em CLs cavitários, a área da cavidade foi calculada e subtraída do área total do CL. No cálculo da área de perfusão sanguínea se utilizou o cursor para verificar a VCL (Fig.2). A determinação do percentual de perfusão sanguínea na área do CL foi realizada por meio da razão entre a área de perfusão sanguínea e área total do CL (%VCL).

Coleta de sangue e ensaio hormonal. Para se avaliar as concentrações séricas de progesterona pré-ovulatórias foram coletadas amostras de sangue, a cada 12 horas, entre o D7 e o momento da ovulação, naqueles animais que não se detectou a ovulação, essa coleta aconteceu até 96 horas após a remoção do implante. Já as concentrações séricas de progesterona pós-ovulatórias foram mensuradas no D24 do protocolo de sincronização (Fig.1).

As coletas foram realizadas por meio da punção dos vasos coccígeos. Todas as amostras foram coletadas em tubos de vácuo de 10mL sem anticoagulante, com ativador de coagulação (VACUTAINER®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e imediatamente refrigerado em isopor contendo gelo mantido em média a 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x G por 10 minutos para separação do soro, transferidas para microtubos de polietileno, alíquotado e armazenado a -20°C até o momento da realização dos ensaios hormonais. As análises da concentração de progesterona foram realizadas pela metodologia de quimioluminescência utilizando o imunoensaio Access immunoassay systems Progesterone (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) validado para soro bovino, conforme especificações do fabricante no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, com uma sensibilidade de 0,1ng/mL. Foram realizados dois ensaios e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 6,2% e 3,5%, respectivamente.

Delineamento experimental e procedimentos estatísticos. Os quatro grupos experimentais foram agrupados em um arranjo fatorial 2x2 com base em um delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 19. Para tanto,

se realizou a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças entre as médias das variáveis avaliadas na ultrassonografia modo B (DFOL7, DFOL9, DFOL11, DFOL, TXFOL, AFOLD7, AFOLD9, AFOLD11, AFOL, DCL, ACL e MOM), na ultrassonografia modo doppler (VFOLD7, VFOLD9, VFOLD11, VFOL, VCL e %VCL) e nas análises das concentrações séricas de progesterona pré e pós-ovulatórias (P4D7, P4D9, P4D11, P4pré e P4) nos diferentes tratamentos foram comparadas utilizando-se Two-way ANOVA considerando no modelo os efeitos de eCG e do 2PGF e a interação entre eles. 3- Para a comparação do diâmetro, da área total da parede e da área de perfusão sanguínea na parede folicular, assim como as concentrações séricas de progesterona pré-ovulatórias entre os tratamentos ao longo do tempo da dinâmica folicular, foi utilizado a Two-way ANOVA com medidas repetidas no tempo, considerando no modelo os efeitos de eCG, 2PGF e a interação entre eles. Para todas as análises foram consideradas diferenças significativas quando o $P < 0,05$, sendo determinadas como tendências diferenças entre $P = 0,05$ e $P \leq 0,10$.

RESULTADOS

Do total de 29 animais, três fêmeas pertencentes, respectivamente, aos Grupos Controle (n=7), 2PGF (n=7) e 2PGF+eCG (n=6) não ovularam até 96 horas após a remoção dos implantes e foram eliminadas do experimento, perfazendo uma taxa de ovulação total de 89,65%. Não foi verificado efeito do eCG, 2PGF e a interação eCG*2PGF para a variável diâmetro folicular, área da parede folicular, área de perfusão na parede folicular e concentração sérica pré-ovulatória de progesterona ao longo tempo da dinâmica folicular. Assim como não foi encontrado efeito do eCG, 2PGF e a interação eCG*2PGF em nenhuma das variáveis avaliadas em cada momento da dinâmica folicular e para os parâmetros estruturais e funcionais pós-ovulatórios do CL.

A Figura 3 representa o efeito dos protocolos de IATF com uma e duas doses de PGF2 α associado ou não ao emprego da eCG sobre as características foliculares analisadas por ultrassonografia modo B. Não foi verificada diferença significativa para nenhuma das dimensões foliculares avaliadas em cada momento da dinâmica folicular. Na comparação entre os tratamentos ao longo do tempo a variável diâmetro folicular e área da parede folicular apresentaram um comportamento semelhante, não sendo observada diferença estatística entre os grupos conforme ilustrados na Figura 3, sugerindo que todos os protocolos de sincronização estimularam de forma equitativa o crescimento folicular.

No entanto, houve uma tendência de ovulação mais precoce em torno de 62,00 \pm 9,03 horas após a remoção dos implantes de progesterona nos animais do tratamento 2PGF+eCG em relação ao 2PGF que ovularam em média 77,14 \pm 11,71 horas. Para o Grupo Controle e o Grupo eCG as ovulações ocorreram, respectivamente, em média 72,00 \pm 12,00 horas e 66,00 \pm 6,57 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona semelhante aos demais (Fig.3).

Na dinâmica folicular por ultrassonografia modo doppler os distintos protocolos hormonais não afetaram os parâmetros de perfusão sanguínea na área da parede folicular, apresentando apenas uma tendência a uma maior área de perfusão sanguínea (VFOL11) no D11 no Grupo eCG em relação ao Grupo 2PGF. Na análise da área de perfusão sanguínea da parede folicular,

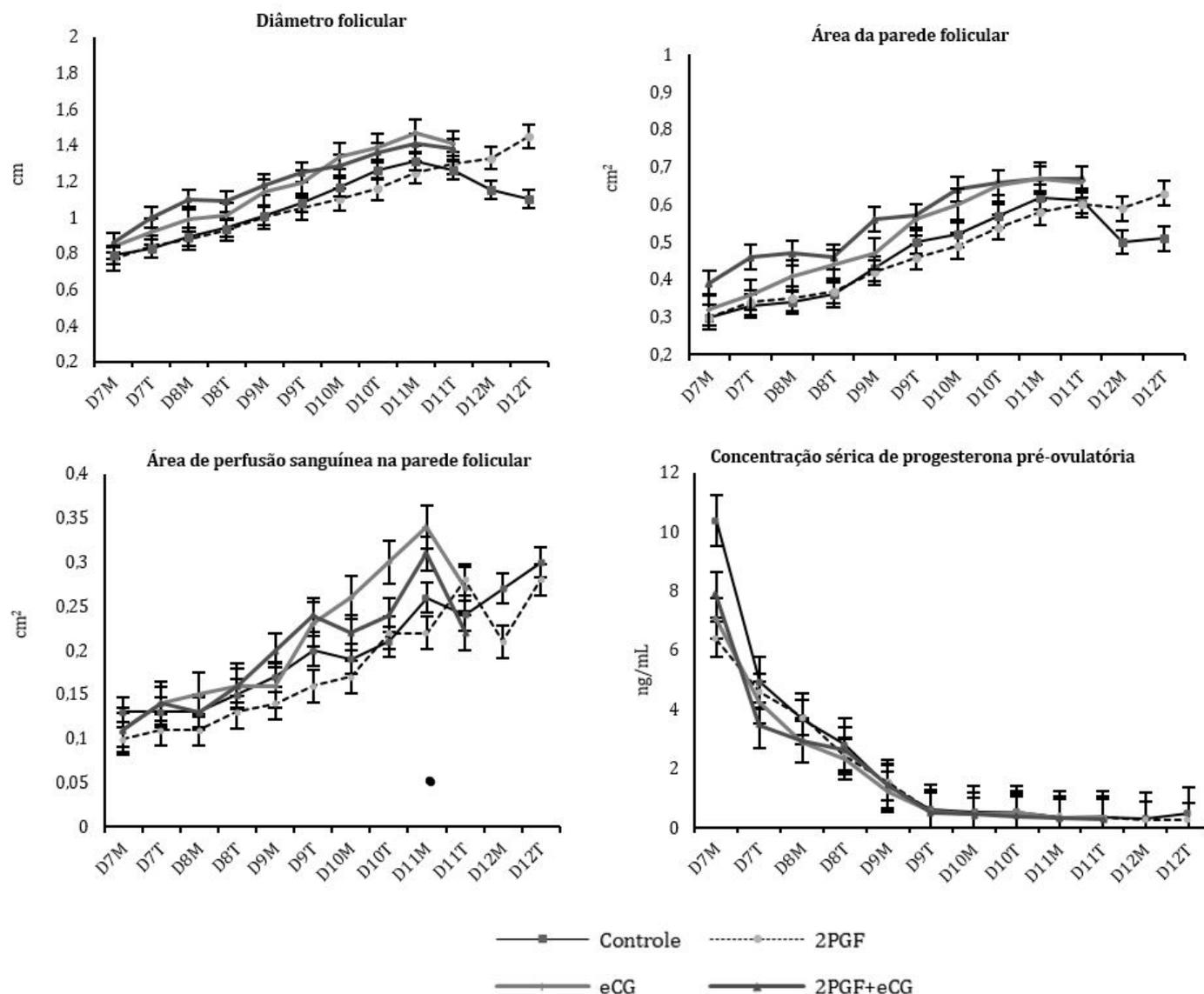


Fig.3. Comparação da média do diâmetro folicular (cm), área da parede folicular (cm²), área de perfusão sanguínea na parede folicular (cm²) e concentração sérica de progesterona (ng/mL) entre os quatro distintos protocolos de sincronização (controle, 2PGF, eCG e 2PGF+eCG) a partir do dia sete (D7) do programa de IATF até a ovulação. M = Manhã, T = Tarde.

ao longo do tempo, houve uma equivalência entre todos os protocolos de sincronização, demonstrada na Figura 3.

No que se refere à concentração sérica pré-ovulatória de progesterona, os animais do Grupo 2PGF e 2PGF+eCG demonstraram valores de, respectivamente, $0,39 \pm 0,15$ e $0,32 \pm 0,16$ ng/mL no D11 e $0,29 \pm 0,09$ e $0,30 \pm 0,11$ ng/mL no momento pré-ovulatório, semelhante aqueles esboçados, simultaneamente, pelos Grupos Controle e eCG de $0,37 \pm 0,20$ e $0,33 \pm 0,05$ ng/mL no D11 e $0,29 \pm 0,09$ e $0,35 \pm 0,05$ ng/mL no momento pré-ovulatório. Ao se avaliar as médias das concentrações séricas de progesterona ao longo da dinâmica folicular também se evidenciou semelhança entre os protocolos de sincronização. Desta forma, não foi verificado efeito da dupla dose de um luteolítico sobre a redução das concentrações séricas de progesterona no período pré-ovulatório conforme ilustrado na Figura 3.

A influência dos protocolos para IATF sobre os parâmetros estruturais e funcionais pós-ovulatórios do CL encontra-se resumido no Quadro 1. Não foi observada distinção no tamanho do CL demonstrado pelas variáveis DCL e ACL, assim como nos índices de perfusão sanguínea luteal representados pela VCL e %VCL entre os tratamentos hormonais. Contudo, o Grupo eCG demonstrou tendência a apresentar maior DCL em relação ao Grupo 2PGF e 2PGF+eCG. Adicionalmente a estes achados, também foi constatado tendência a maiores concentrações de progesterona no dia 24 do protocolo nos animais do Grupo eCG ($11,00 \pm 3,32$ ng/mL) em relação ao Grupo 2PGF ($6,37 \pm 1,31$ ng/mL), enquanto os tratamentos Controle e 2PGF+eCG demonstraram resultados intermediários que se assemelham a ambos os grupos, com concentrações de $8,43 \pm 3,85$ e $9,18 \pm 2,82$ ng/mL, respectivamente.

Quadro 1. Influência dos diferentes protocolos de sincronização sobre os parâmetros morfofuncionais pós-ovulatórios do corpo lúteo avaliados por ultrassonografia modo B, doppler e concentração plasmática de progesterona

Variáveis	Protocolos de sincronização				p-valor	Total (Média±S) (n=26)
	Controle (Média±S) (n=7)	2PGF (Média±S) (n=7)	eCG (Média±S) (n=6)	2PGF+eCG (Média±S) (n=6)		
DCL(cm)	2,08±0,35	1,89±0,15	2,28±0,26	1,84±0,44	0,08	2,02±0,34
ACL (cm ²)	3,30±1,06	3,04±0,55	3,76±0,77	2,89±1,24	0,40	3,24±0,94
VCL (cm ²)	1,24±0,70	1,37±0,57	1,17±0,69	0,87±0,35	0,51	1,18±0,59
%VCL (%)	37,18±16,96	46,52±21,80	30,44±16,76	30,85±11,62	0,32	36,69±17,63
P4	8,43±3,85	6,37±1,31	11,00±3,32	9,18±2,82	0,07	8,64±3,26

DCL = diâmetro do corpo lúteo, ACL = área do corpo lúteo, VCL = área de perfusão do corpo lúteo, %VCL = percentual de perfusão sanguínea na área do corpo lúteo, P4 = concentração plasmática de progesterona no dia vinte e quatro do protocolo de sincronização.

DISCUSSÃO

As semelhanças das características estruturais foliculares entre os protocolos de sincronização utilizados no presente estudo demonstraram que as tentativas de ajustes no proestro implementadas, foram incapazes de proporcionar distinções no desenvolvimento folicular entre os animais submetidos à aplicação de uma e duas doses de um luteolítico simultâneo ou não ao estímulo da eCG.

No entanto, alguns estudos de Brusveen et al. (2009) e Ribeiro et al. (2012) em vacas de leite determinaram a importância de se empregar a dupla dose de PGF2 α para a promoção de uma perfil endócrino ideal no período pré-ovulatório em protocolos de IATF, aumentando a expressão do estro e o desenvolvimento folicular em relação aos animais submetidos a uma única aplicação do fármaco. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de distúrbios na luteólise promoverem uma ausência de regressão completa do CL e a manutenção de altos níveis pré-ovulatórios de progesterona impactando negativamente no desenvolvimento folicular e nos índices de ovulação nos protocolos de IATF (Martins et al. 2011, Nascimento et al. 2014).

Em contraposição as afirmações supracitadas, não foi observado efeito da duplicação da dose de um luteolítico sobre a dinâmica folicular neste estudo, os animais dos Grupos 2PGF e 2PGF+eCG apresentaram características foliculares morfológicas semelhante aqueles do Grupo Controle e eCG. Concordando aos trabalhos de Santos et al. (2010) e Pereira et al. (2015), os quais não constataram diferenças nos diâmetros foliculares no momento da aplicação da PGF2 α e no momento da IATF entre animais tratados com uma e duas doses de um luteolítico. Garcia-Ispierto & López-Gatius (2014) e López-Gatius et al. (2015) em estudos muito semelhantes a esta pesquisa, porém em protocolos de curta duração a base de GnRH em vacas de leite de alta produção, também não evidenciaram distinções entre as estruturas foliculares em protocolo com associação de uma e duas doses de PGF2 α ao uso ou não da eCG. Estes resultados associados aos dados do presente estudo sugerem que uma única dose de um luteolítico foi eficiente em promover o crescimento folicular equitativo nos distintos grupos experimentais.

Diversos estudos apontaram a ação benéfica da eCG sobre o crescimento folicular na IATF, sugerindo sua utilização como ferramenta de incremento das dimensões foliculares, da esteroidogênese e da resposta ovulatória de fêmeas leiteiras

submetidas a protocolos de IATF, sobretudo nos animais acíclicos, com baixos escores de condição corporal e criados à pasto (Bó et al. 2013, Rensis & López-Gatius 2014).

Divergindo deste experimento, Peres et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010) trabalharam com programas de sincronização em fêmeas *Bos taurus indicus* tratadas ou não com eCG e obtiveram um diâmetro folicular no momento da IATF, significativamente superior em animais que houve a administração da eCG em relação aqueles do Grupo Controle. Em complementação a estes achados Peres et al. (2009) observaram que a aplicação da PGF2 α dois dias antes da remoção da progesterona exerceu efeitos positivos sobre as características foliculares e minimizou a influência do não tratamento com eCG. Dias et al. (2009) confirmaram estes resultados em novilhas *Bos taurus indicus*, demonstrando que o suporte gonadotrófico é essencial sobretudo em protocolos de sincronização com curto proestro. Contudo no presente estudo todos os grupos experimentais esboçaram um proestro longo, de cerca de 4 dias, o qual pode ter favorecido o crescimento folicular promovendo uma equivalência entre parâmetros foliculares dos animais tratados ou não com eCG.

De forma semelhante ao presente estudo, Pulley et al. (2013) e Ferreira et al. (2013) desenvolveram experimentos com dinâmica folicular em vacas leiteiras com o uso ou não de diferentes doses de eCG e concordando com os resultados expostos nesta pesquisa, não verificaram distinções nas características do foliculo dominante no momento da remoção do dispositivo de progesterona e da IATF, assim como no tamanho do foliculo pré-ovulatório, nas taxas de crescimento e de ovulação. Os autores justificaram tal achado pelo fato de terem trabalhado com vacas leiteiras de alta produção com dietas extremamente energéticas apresentando grande estímulo endógeno de LH para sustentar o crescimento folicular, não necessitando de suporte gonadotrófico exógeno.

Subseqüentemente, Souza et al. (2009) e Garcia-Ispierto et al. (2012) evidenciaram que o efeito positivo da eCG em fêmeas de alta produção ocorreu apenas em animais com baixo escore corporal e longo período de anestro pós-parto. Desta forma, apesar deste experimento não se tratar de vacas leiteiras de alta produção e utilizar fêmeas mestiças comerciais criadas à pasto, a limitada ação da eCG neste trabalho pode ser explicada devido a todos os animais utilizados se encontrarem em uma condição cíclica confirmada pela presença do CL, além de um adequado ECC e

longo proestro, apresentando suficiente suporte gonadotrófico para o crescimento folicular e a ovulação.

Os resultados deste experimento sugerem que os parâmetros estruturais foliculares parecem não serem afetados pelas pequenas tentativas de manipulação no final dos protocolos de IATF. Contudo, verifica-se uma escassez de estudos, avaliando por meio da dinâmica folicular por ultrassonografia modo doppler, a capacidade destas estratégias ajustarem o proestro de vacas mestiças (Ayres & Mingoti 2012, Viana et al. 2013).

O desenvolvimento folicular foi intimamente relacionado à formação da rede de vasos sanguíneos na camada folicular de células da teca com constante neovascularização para atender as crescentes necessidades metabólicas dos folículos em desenvolvimento, deste modo a análise da área de perfusão sanguínea da parede do folículo por ultrassonografia doppler pode proporcionar uma maior precisão para a dinâmica folicular, fornecendo informações sobre viabilidade folicular e maturidade oocitária em fêmeas bovinas (Siddiqui et al. 2009a, 2009b, Ginther et al. 2014).

No presente estudo houve uma criteriosa avaliação dos parâmetros foliculares mensurando os níveis de perfusão sanguínea do folículo dominante, no entanto, em relação a esta característica também não foi constatado efeito dos tratamentos sobre os parâmetros vasculares da parede folicular, sendo observada apenas uma tendência a maior área de perfusão sanguínea na parede folicular no D11 em animais do Grupo eCG em relação a animais do Grupo 2PGF. Deste modo pode-se confirmar que as tentativas de ajustes no proestro por meio do emprego de duas doses de PGF2 α e a inclusão da eCG foram ineficientes em incrementar os parâmetros morfológicos do folículo dominante e pré-ovulatório na IATF.

No que refere à função luteal pré-ovulatória, alcançar a luteólise completa constitui um ponto chave dos protocolos de IATF (Wiltbank et al. 2014). Diversos pesquisadores têm demonstrado que mínimos níveis séricos de progesterona foram cruciais para se criar um ambiente endócrino ideal no momento da IA, existindo evidências de que elevações suaves da progesterona sérica durante o período pré-ovulatório impactaram negativamente na fertilidade de vacas leiteiras cíclicas (Santos et al. 2010, Pereira et al. 2013b).

O mecanismo pelo qual as mínimas concentrações de progesterona pré-ovulatórias afetam a performance reprodutiva envolve incremento nas taxas de ovulação, além de alterações morfológicas e funcionais nas tubas uterinas com maior expressão de receptores de estrógenos, capacitação espermática e consequente fertilização (Binelli et al. 2014a, 2014b).

Brusveen et al. (2009), Santos et al. (2010), Ribeiro et al. (2012) e Wiltbank et al. (2015), em estudos com IATF em fêmeas leiteiras, determinaram que a adição de uma dose de um luteolítico foi eficaz em reduzir os níveis de progesterona em relação a animais submetidos a uma única injeção. Assim, no presente estudo acreditava-se que o aumento do número de doses de PGF2 α ampliaria a regressão luteal com concentrações de progesterona significativamente inferiores nos animais submetidos a estes tratamentos, porém estes resultados não foram esboçados, as fêmeas do Grupo 2PGF e 2PGF+eCG apresentaram concentrações de progesterona similares aquelas do Grupo Controle e eCG no momento da IATF e no momento pré-ovulatório.

Resultados equivalentes também foram reportados, porém em vacas de alta produção, por Pereira et al. (2013a) que obtiveram concentrações de progesterona no momento da IATF de 0,18ng/mL nas fêmeas submetidas a duas aplicações de PGF2 α similares a 0,21ng/mL esboçadas por animais que receberam um único tratamento. Estes achados associados aos dados deste trabalho fortalecem as evidências de que o tratamento com PGF2 α dois dias antes da remoção dos dispositivos de progesterona, empregado em todos os grupos experimentais desta pesquisa proporcionaram maior tempo para o decréscimo uniforme das concentrações deste hormônio alcançando níveis mínimos pré-ovulatórios de progesterona, sugerindo que uma única dose de um luteolítico no protocolo de IATF com longo proestro foi suficiente para promover um adequado padrão de regressão luteal em fêmeas mestiças.

Em relação aos parâmetros pós-ovulatórios morfológicos do CL não foi observado efeito dos tratamentos sobre as dimensões estruturais e vasculares, corroborando aos resultados alcançados recentemente nas pesquisas de Pereira et al. (2013a, 2015), nas quais não houveram diferenças significativas para as características luteais pós-ovulatórias entre animais tratados com uma e duas doses de PGF2 α em um protocolo de IATF em vacas leiteiras.

Contudo, no presente experimento foi observada uma tendência a maior DCL no Grupo eCG em comparação aos Grupos 2PGF e 2PGF+eCG, assim como tendência a elevada concentração sérica de progesterona no momento pós-ovulatório nos animais tratados com eCG em relação ao 2PGF. De forma similar, Souza et al. (2009) e Ferreira et al. (2013), ao desenvolverem protocolos de IATF com uso ou não da eCG em fêmeas bovinas de alta produção, encontraram uma tendência a maior volume luteal e concentrações séricas de progesterona após a ovulação para os animais que receberam o suporte da eCG previamente a IA. Baruselli et al. (2004) e Peres et al. (2009) reportaram maiores concentrações de progesterona em fêmeas submetidas ao tratamento com 300UI de eCG em comparação aos animais não tratados, porém sem observar alterações no diâmetro do CL.

Estes achados podem ser suportados pelo fato da eCG ser um fármaco de lento metabolismo e quando administrado na IATF age a nível folicular promovendo uma elevação da atividade gonadotrófica nas células da teca e da granulosa com consequente formação de estruturas luteais maiores e mais ativas após a ovulação. Este fármaco atua também no início da luteogênese incrementando a função das grandes células luteais e a síntese de progesterona (Rensis & López-Gatius 2014).

Adicionalmente a estes achados, a avaliação da perfusão sanguínea luteal pós-ovulatória realizada neste estudo, trouxe fortes evidências de que todos os tratamentos empregados proporcionaram a formação de CLs com adequados parâmetros estruturais e funcionais. Uma vez que se obteve uma irrigação luteal semelhante entre os protocolos de sincronização e uma adequada perfusão sanguínea é essencial para o suprimento de nutrientes, substratos e hormônios estimuladores e reguladores indispensáveis para a secreção de progesterona (Viana et al. 2013, Ayres & Mingoti 2012).

É importante destacar que no presente estudo, a duração do proestro foi um parâmetro uniforme em todos os tratamentos e segundo relatos de Dadarwal et al. (2013) constitui um fator crucial nos protocolos de sincronização de animais

cíclicos, em face as evidências de que o prolongamento do proestro por meio da antecipação do tratamento com PGF2 α em protocolo a base de progesterona e benzoato de estradiol parece possibilitar um eficiente aumento dos parâmetros estruturais foliculares, das características pós-ovulatórias morfológicas e funcionais do CL com consequente incremento dos índices de fertilidade.

Deste modo, as tentativas de manipulação do proestro testadas em fêmeas mestiças neste estudo por meio da associação entre a dupla dose de PGF2 α e a eCG não impactaram a dinâmica folicular, a função luteal pré-ovulatória e as características morfofuncionais pós-ovulatória do CL, evidenciando que o longo proestro alcançado em todos os protocolos de sincronização, com duração de aproximadamente quatro dias pode ter sido eficaz em incrementar e favorecer a atividade folicular e função luteal pós-ovulatória, minimizando o efeito das demais estratégias testadas como a dupla dose de um luteolítico e o estímulo da eCG.

CONCLUSÃO

As tentativas de ajustes no proestro por meio do uso de uma e duas doses de um luteolítico associada ou não ao eCG foram incapazes de melhorar a qualidade folicular e minimizar a função luteal pré-ovulatória, assim como não incrementaram a morfologia do CL e a função luteal pós-ovulatória, sugerindo que em animais cíclicos mestiços, protocolos convencionais de IATF com a utilização de uma única dose PGF2 α e sem o suporte gonadotrófico da eCG parece proporcionar uma adequada resposta folicular e luteal.

REFERÊNCIAS

- Arêas V.S. 2012. Uso de Doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre. Disponível em <http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/5109/1/tese_6068 DISSERTA%C3%87%C3%83O%20-%20VAGNER%20SARMENTO.pdf> Acesso em 7 mar. 2016.
- Ayres H. & Mingoti G.Z. 2012. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 36(3):174-180.
- Baruselli P.S., Reis E.L., Marques M.O., Nasser L.F. & Bó G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82(83(1):479-486. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>> <PMid:15271474>
- Baruselli P.S., Sales J.N.S., Sala R.V., Vieira L.M. & Sá Filho M.F. 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim. Reprod.* 9(3):139-152.
- Binelli M., Sartori R., Vasconcelos J.L.M., Monteiro Junior P.L.J., Pereira M.H.C. & Ramos R.S. 2014a. Evolution in Fixed-Time: from synchronization of ovulation to improved fertility. *Context, Leicestershire.* Disponível em <https://www.researchgate.net/profile/Mario_Binelli/publication/268506071_Fertility_of_fixed-time_protocols_in_dairy_cattle_Evolution_in_fixed-time_from_synchronization_of_ovulation_to_improved_fertility/links/546cf4280cf2a7492c55aefa.pdf> Acesso 5 mar. 2016.
- Binelli M., Pugliesi G., Hoeck V.V., Sponchiado M., Ramos R.S., Oliveira M.L. & França M.R. 2014b. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim. Reprod.* 11(3):246-253.
- Bó G.A., Baruselli P.S. & Mapletoft R.J. 2013. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 10(3):137-142.
- Brusveen D.J., Souza A.H. & Wiltbank M.C. 2009. Effects of additional prostaglandin F 2 α and estradiol-17 β during Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(4):1412-1422. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1289>> <PMid:19307622>
- Cavalieri J., Hepworth G., Fitzpatrick L.A., Shephard R.W. & Macmillan K.L. 2006. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65(1):45-64. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.005>> <PMid:16278012>
- Dadarwal D., Mapletoft R.J., Adams G.P., Pfeifer L.F.M., Creelman C. & Singh J. 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 79(5):859-866. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.003>> <PMid:23394971>
- Dias C.C., Wechsler F.S., Day M.L. & Vasconcelos J.L.M. 2009. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology* 72(3):378-385. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.006>> <PMid:19477500>
- Ferreira R.M., Ayres H., Sales J.N.S., Souza A.H., Rodrigues C.A. & Baruselli P.S. 2013. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 140(1/2):26-33. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.014>> <PMid:23727121>
- García-Ispuerto I. & López-Gatius F. 2014. Effects of different five-day progesterone-based fixed-time AI protocols on follicular/luteal dynamics and fertility in dairy cows. *J. Reprod. Develop.* 60(6):426-432. <<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2014-063>> <PMid:25196275>
- García-Ispuerto I., López-Helguera I., Martino A. & López-Gatius F. 2012. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. *Reprod. Dom. Anim.* 47(5):752-758. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01954.x>> <PMid:22117847>
- Ghetti A.M. 2012. Caracterização por Doppler Colorido do Padrão Vascular em folículos dominantes pré e pós aspiração e efeito do benzoato de estradiol nos folículos residuais subsequentes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, Niterói. Disponível em <<http://www.uff.br/clinicaveterinaria/teses/M244.pdf>> Acesso em 9 mar. 2016.
- Ginther O.J., Siddiqui M.A.R., Baldrighi J.M. & Hoffman M.M. 2014. Effect of intraovarian proximity between dominant follicle and corpus luteum on dimensions and blood flow of each structure in heifers. *Theriogenology* 82(6):875-883. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.022>> <PMid:25091526>
- Giordano J.O., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Bas S., Pawlisch R.A., Guenther J.N. & Nascimento A.B. 2013. Effect of increasing GnRH and PGF2 α dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 80(7):773-783. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.003>> <PMid:23932174>
- Houghton P.L., Lemenager R.P., Moss G.E. & Hendrix K.S. 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *J. Anim. Sci.* 68(1):1428-1437.
- Leal L.D.S., Oba E., Fernandes C.A.D.C. & Sá Filho O.G.D. 2009. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações séricas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. *Ciênc. Anim. Bras.* 10(1):174-183.
- López-Gatius F., López-Helguera I., De Rensis F. & García-Ispuerto I. 2015. Effects of different five-day progesterone-based synchronization protocols on the estrous response and follicular/ luteal dynamics in dairy cows. *J. Reprod. Dev.* 61(5):465-471. <<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2015-053>> <PMid:26211922>
- Martins J.P.N., Policelli R.K. & Pursley J.R. 2011. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. *J.*

- Dairy Sci. 94(6):2806-2814. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3650>> <PMid:21605750>
- Murphy B.D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* 9(3):223-230.
- Nascimento A.B., Souza A.H., Keskin A., Sartori R. & Wiltbank M.C. 2014. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF2 α in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 81(3):389-395. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.009>> <PMid:24252637>
- Núñez-Oliviera R., Castro T., García-Pintos C., Bó G., Piaggio J. & Menchaca A. 2014. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 146(3/4):111-116. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>> <PMid:24646633>
- Pereira M.H.C., Rodrigues A.D.P., Martins T., Oliveira W.V.C., Silveira P.S.A., Wiltbank M.C. & Vasconcelos J.L.M. 2013a. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *J. Dairy Sci.* 96(11):6904-6914. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6260>> <PMid:24054286>
- Pereira M.H.C., Sanches C.P., Guida T.G., Rodrigues A.D., Aragon F.L., Veras M.B., Borges P.T., Wiltbank M.C. & Vasconcelos J.L. 2013b. Timing of prostaglandin F 2 α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96(5):2837-2846. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5840>> <PMid:23498008>
- Pereira M.H.C., Wiltbank M.C., Barbosa L.F.S.P., Costa Junior W.M., Carvalho M.A.P. & Vasconcelos J.L.M. 2015. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *J. Dairy Sci.* 98(2):947-959. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8523>> <PMid:25434339>
- Peres R.F., Claro Junior I., Sá Filho O.G., Nogueira G.P. & Vasconcelos J.L. 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 72(5):681-689. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.026>> <PMid:19559472>
- Pulley S.L., Wallace L.D., Mellieon Junior H.I. & Stevenson J.S. 2013. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 79(1):127-134. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.017>> <PMid:23131466>
- Rensis F. & López-Gatius F. 2014. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. *Reprod. Dom. Anim.* 49(2):177-182. <<http://dx.doi.org/10.1111/rda.12268>> <PMid:24456154>
- Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L.A., Silvestre F.T., Greco L.F., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78(2):273-284. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.012>> <PMid:22578621>
- Sá Filho M.F., Ayres H., Ferreira R.M., Marques M.O., Reis E.L., Silva R.C.P., Rodrigues C.A., Madureira E.H., Bó G.A. & Baruselli P.S. 2010. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 73(5):651-658. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>> <PMid:20080296>
- Santos J.E.P., Narciso C.D., Rivera F., Thatcher W.W. & Chebel R.C. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(7):2976-2988. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2870>> <PMid:20630214>
- Sartori R., Bastos M.R., Baruselli P.S., Gimenes L.U., Ereno R.L. & Barros C.M. 2010. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Soc. Reprod. Fert.* 67(1):357-375. <PMid:21755684>
- Siddiqui M.A.R., Almamun M. & Ginther O.J. 2009a. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 113(1/4):287-292. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.07.008>> <PMid:18768270>
- Siddiqui M.A., Gastal E.L., Gastal M.O., Almamun M., Beg M.A. & Ginther O.J. 2009b. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction* 137(4):689-697. <<http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0403>> <PMid:19176313>
- Souza A.H., Viechnieski S., Lima F.A., Silva F.F., Araujo R., Bó G.A., Wiltbank M.C. & Baruselli P.S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72(1):10-21. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>> <PMid:19269685>
- Viana J.H.M., Arashiro E.K.N., Siqueira L.G.B., Ghetti A.M., Areas V.S., Guimarães C.R.B., Palhao M.P., Camargo L.S.A. & Fernandes C.A.C. 2013. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. *Anim. Reprod.* 10(3):215-222.
- Wiltbank M.C. & Pursley J.R. 2014. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81(1):170-185. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.017>> <PMid:24274420>
- Wiltbank M.C., Baez G.M., Vasconcelos J.L.M., Pereira M., Souza A.H., Sartori R. & Pursley J.R. 2014. The physiology and impact on fertility of the period of proestrus in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 11(3):225-236.
- Wiltbank M.C., Baez G.M., Cochrane F., Barletta R.V., Trayford C.R. & Joseph R.T. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F2 α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(12):8644-8654. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9353>> <PMid:26433418>