



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JEFFERSON TADEU DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROGESTERONA INJETÁVEL DE  
LONGA AÇÃO NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS  
NELORE SUBMETIDAS À PROTOCOLOS DE IATF**

---

Londrina  
2016

JEFFERSON TADEU DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROGESTERONA INJETÁVEL DE  
LONGA AÇÃO NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS  
NELORE SUBMETIDAS À PROTOCOLOS DE IATF**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência Animal para obtenção  
do Título de Doutor.

Orientador: Prof.Dr.Marcelo Marcondes Seneda

Londrina  
2016

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C198a Campos, Jefferson Tadeu de.

Avaliação do uso de progesterona injetável de longa ação na taxa de concepção em vacas Nelore submetidas à protocolos de IATF / Jefferson Tadeu de Campos. – Londrina, 2016.

53 f.: il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Bovino x Inseminação artificial. – Teses. 2. Hormonioterapia em animais. – Teses. 3. Ovolução. – Teses. 4. Reprodução animal. Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.45

JEFFERSON TADEU DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO USO DE PROGESTERONA INJETÁVEL DE LONGA  
AÇÃO NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS NELORE  
SUBMETIDAS À PROTOCOLOS DE IATF**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência Animal para  
obtenção do Título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes  
Seneda  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavaliere  
Centro Universitário de Maringá -  
UNICESUMAR

---

Prof. Dr. Celso Koetz Junior  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Mello Matins  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 12 de Setembro de 2016.

**DEDICO,**

Este trabalho aos meus queridos amigos, companheiros de todos os momentos, bons e ruins: muito obrigado vocês foram muito importante para mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pelo incentivo e presteza no auxílio as atividades, principalmente sobre a correção e normatização deste trabalho, onde com toda certeza seus conhecimentos foram partilhados

A universidade pela oportunidade de fazer o curso.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meu muito obrigado.

Agradeço aos colegas de profissão pela espontaneidade e alegria na troca de informações numa rara demonstração de amizade, e em especial ao colega de turma Fábio Morotti que desde o mestrado participou diretamente em todos os trabalhos.

E, finalmente, agradeço a Deus pela oportunidade, privilégio e sustentação. Ele é amigo incondicional, meu maior ouvinte. Que me socorreu nas horas que mais precisei, obrigado.

CAMPOS, Jefferson Tadeu de. **Avaliação do uso de progesterona injetável de longa ação na taxa de concepção em vacas nelore submetidas à protocolos de IATF**. 2016. 53f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

O presente trabalho refere-se a uma progesterona injetável para ser utilizada em protocolos de sincronização da ovulação, com uma única aplicação por via intramuscular. Foram realizados dois experimentos com os seguintes objetivos: i) avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes e não lactantes submetidas à IATF, com um protocolo a base de progesterona injetável. ii) avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF com progesterona injetável ou com progesterona de dispositivo intravaginal. No primeiro experimento com vacas não lactantes (n=422) 38,3% tornaram-se prenhes(162/422) 60 dias após a IATF. Enquanto que vacas lactantes (n=516) 32,1% (166/516) estavam prenhes 60 dias após a IATF com protocolo hormonal de progesterona injetável. No segundo estudo vacas nelores (n= 135) foram aleatoriamente distribuídos em três (n=45) grupos experimentais sendo: Grupo I (P4 injetável/IATF 36 horas); Grupo II (P4 injetável/IATF 48 horas) e Grupo III (Controle/Progesterona intravaginal 1,9 mg). O resultado com relação a taxa de prenhez ficou assim distribuída; Grupo I (P4 injetável/IATF 36 horas): 33,3%, Grupo II (P4 Injetável/IATF 48 horas): 48,9% e o Grupo (Controle/Pregesterona intravaginal 1,9 mg): 60% As vacas inseminadas 48 horas após a indução da ovulação apresentaram taxas de prenhez superior as que foram inseminadas com 36 e inferior as do grupo controle.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*. Inseminação Artificial em Tempo Fixo. Nelore. Progesterona injetável.

CAMPOS, Jefferson Tadeu de. **Evaluation of Injectable progesterone use of long-acting in conception rates in Nelore cows submitted to FTAI protocols.** 2016. 53p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

### ABSTRACT

The present work relates to an injectable progesterone for use in synchronization protocols of ovulation, with a single intramuscular application. Two experiments were conducted with the following objectives: i) to evaluate the pregnancy rate in lactating Nelore cattle and non-lactating submitted to FTAI with a protocol injectable progesterone base. ii) evaluate the pregnancy rate of Nelore cows submitted to FTAI protocols with injectable progesterone or intravaginal progesterone device. In the first experiment with non-lactating cows (n = 422) 38.3% became pregnant (162/422) 60 days after FTAI. While dairy cows (n = 516) 32.1% (166/516) were pregnant 60 days after FTAI protocol with hormonal injectable progesterone. In the second study Nelore cows (n = 135) were randomly divided into three (n = 45) experimental groups as follows: Group I (injectable P4 / FTAI 36 hours); Group II (injectable P4 / FTAI 48 hours) and group III (Control / intravaginal progesterone 1.9 mg). The outcome with respect to pregnancy rate was distributed as follows; Group I (injectable P4 / FTAI 36 hours): 33.3%, Group II (P4 Injectable / FTAI 48 hours): 48.9% and the group (Control / intravaginal Progesterona 1.9 mg): 60% The cows inseminated 48 hours after induction of ovulation had higher pregnancy rates that were inseminated with 36 and less than the control group.

**Keywords:** *Bos indicus*. Artificial Insemination in Fixed Time. Nelore. Injectable Progesterone.

## LISTAS DE TABELAS

### Artigo A

<b>Table 1-</b> Pregnancy rates of lactating and non-lactating Nelore cows subjected to FTAI protocol with injectable progesterone .....	34
--	----

## LISTAS DE FIGURAS

### Artigo A

- Figure 1-** Schematic representation of the FTAI protocol with injectable progesterone used for synchronization in Nelore cows .....33

### Artigo B

- Figure 1-** Schematic representation of the three different synchronization protocols of ovulation that were tested Nelore cows (*Bos indicus*) using an injectable P4 solution (FTAI 36 or 48 hours after ovulation induction) or an intravaginal P4 device .....45
- Figure 2-** Pregnancy rates in Nelore cows (*Bos indicus*) that were submitted to a synchronization of ovulation (FTAI) using an injectable P4 solution/FTAI 36 hours, P4 injectable/FTAI 48 hours, or an intravaginal P4 device .....46

## LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Corpo lúteo
d	Dia
E2	Estradiol
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
TE	Transferência de embrião
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas
mL	Mililitro
ng	Nanograma
P4	Progesterona
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
US	Ultra-som
[P4d0]	Concentração Sérica de Progesterona no dia 0
[P4d7]	Concentração Sérica de Progesterona no dia 7
BE	Benzoato de estradiol
ECP	Cipionato de estradiol
FD	Folículo dominante
CL	Diâmetro do corpo lúteo
OBS CIO	Observação de cio
VE	Valerato de estradiol
H	hora
ECG	Gonadotrofina coriônica equina
ECC	Escore de condição corporal
DG	Diagnóstico de gestação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES HORMONAIS PARA PROGRAMAS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO .....	15
2.2	DESAFIOS NO PÓS-PARTO DA FÊMEA BOVINA: NUTRIÇÃO E CICLICIDADE .....	17
2.3	P4 INJETÁVEL E SEU USO NOS PROTOCOLOS DE IATF .....	19
<b>4</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
5.1	OBJETIVO GERAL .....	22
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>6</b>	<b>ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>23</b>
6.1	ARTIGO A: AVALIAÇÃO DA TAXA DE PREENHEZ DE VACAS NELORE LACTANTES E NÃO LACTANTES SUBMETIDAS A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO-FIXO A BASE DE PROGESTERONA INJETÁVEL .....	23
6.2	ARTIGO B: AVALIAÇÃO DA TAXA DE PREENHEZ DE VACAS <i>BOS INDICUS</i> SUBMETIDAS A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DIFERENTES PROTOCOLOS A BASE DE PROGESTERONA INJETÁVEL OU DISPOSITIVO INTRAVAGINAL.....	35
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro representa 21,46% do PIB total do qual o setor pecuário representa um seguimento de expressiva participação uma vez que o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo com aproximadamente 215 milhões de cabeça de bovinos (CEPEA, 2015). Apesar desse cenário promissor a taxa de desfrute da pecuária Brasileira de 2002 a 2011 girou em torno de 20,3%, muito inferior a dos EUA (35,5%) e Australiana (33,0%) segundo USDA (2014) (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). Portanto uma melhoria na eficiência da pecuária nacional poderia aumentar a taxa de desfrute e com isso melhorar o retorno financeiro do País. Sob o ponto de vista econômico a eficiência reprodutiva é considerada cinco vezes mais importante que ganho de peso e dez vezes mais importante que o rendimento de carcaça (TRENKLE; WILHAM, 1977). Além da taxa de nascimento, do intervalo entre partos e do período de serviço influenciar a eficiência reprodutiva e produtiva do plantel, o estado fisiológico e o manejo nutricional das fêmeas são considerados de suma importância.

O estado de ciclicidade da fêmea após o puerpério pode impactar na eficiência reprodutiva do plantel devido a baixa taxa de serviço. Isto porque vacas no pós parto especialmente *Bos indicus* apresentam uma baixa taxa de estro, fator considerado essencial e limitante para o emprego da inseminação artificial (IA) convencional. A nutrição do plantel pode acentuar tal condição, pois falhas no manejo nutricional, principalmente a baixa disponibilidade de alimentos, podem determinar uma baixa condição corporal, resultando em índice de eficiência reprodutiva inferior, se comparado ao plantel que possui condição corporal satisfatória.

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma ferramenta que facilita o manejo dos programas de inseminação artificial, por permitir a inseminação de um grande número de fêmeas, sem a necessidade de observação do estro. Portanto, além de viabilizar seu próprio emprego, facilita a introdução de material genético de alta qualidade, e otimiza a eficiência reprodutiva do rebanho.

Dentre as estratégias para se melhorar a eficiência reprodutiva de vacas de corte, as técnicas de manejo e o uso do controle farmacológico do ciclo estral se destacam como mais efetivas práticas por serem capazes de induzir a ciclicidade e/ou ovulação em um grande número de fêmeas.

Os protocolos utilizados para inseminação artificial e transferência de embriões (TE) em tempo fixo foram desenvolvidos com base no conhecimento do controle endócrino do ciclo estral das diferentes espécies. A partir deste conhecimento e utilizando estratégias farmacológicas específicas, tornou-se possível o controle das fases de desenvolvimento folicular, recrutamento, seleção e ovulação. Dentre os hormônios empregados nesse protocolo a progesterona (P4) se caracteriza por uma das principais fontes hormonais para sincronização das ondas foliculares, sendo responsável pelo bloqueio do estro e ovulação por retroalimentação negativa sobre o pico de hormônio luteinizante (LH), permitindo o crescimento dos folículos durante o período de tratamento. Atualmente a forma mais comum de progesterona (P4) utilizadas nos protocolos para sincronização do estro/ovulação é apresentadas como dispositivos intravaginais de silicone impregnado com progesterona (P4) natural de liberação lenta. Esses dispositivos necessitam de um aplicador para sua inserção intravaginal, sendo necessário seguir a recomendação do fabricante para com os cuidados de higienização dos dispositivos e uma mão de obra qualificada para colocação exata do implante de forma a evitar traumas, contaminações e perda dos dispositivos. Um dos benefícios das IATF está exatamente na taxa de serviço que é de 100%, para um determinado lote destinado ao programa de inseminação. No entanto se considerarmos que esses dispositivos tem uma perda de até 3% no decorrer com o protocolo admitida pelo próprio fabricante, o protocolo já não apresenta a taxa de serviço preconizada pela técnica. Outro fator a ser considerado em relação à utilização dos dispositivos refere-se ao destino dado os dispositivos após sua utilização, visto que não há uma logística reversa no recolhimento de embalagens como ocorre com as embalagens de agrotóxicos no setor agrícola.

Atualmente cerca de 12 milhões de fêmeas bovinas são inseminadas anualmente no Brasil, com potencial de para ao menos 80% destes animais receberem um protocolo de IATF. Portanto, se considerarmos que cada fêmea recebe um dispositivo de P4 para sincronização da IATF, há potencialmente milhares de dispositivos que após o uso não se sabe ao certo qual o destino é dado a esses dispositivos, que muitas vezes são descartados na própria fazenda.

Sob outro aspecto a reutilização de dispositivos intra vaginais envolve uma série de procedimentos de higiene e cuidados no armazenamento que exigem tempo, mão de obra cuidadosa, para serem evitadas possíveis infecções do

trato reprodutivo. Portanto a logística de higienização, armazenamento, reutilização e descarte dos dispositivos de P4 também representam um desafio adicional para ampliar o crescimento da IATF no Brasil.

Considerando os temas apresentados acima, a utilização de uma fonte de P4 injetável em protocolos de IATF se apresenta como uma alternativa bastante interessante. Facilidade de manejo, não necessidade de descarte de dispositivo, ausência de perdas de dispositivos durante o protocolo, menor custo de IATF representa potenciais vantagens. O Objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de uma fonte injetável de P4 em protocolos de IATF para gado zebuino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O desempenho reprodutivo é um fator limitante na produção de bovinos de corte (MORALES; CAVESTANY, 2012) e está diretamente relacionado com o período de serviço e com o intervalo entre partos, uma vez que sua ampliação diminui o número de crias durante a vida reprodutiva da matriz (BORGES et al., 2009). Assim o sucesso na produção de bovinos de corte é dependente da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS; WALTON, 2000), as quais devem receber atenção privilegiada, para seleção adequada de animais adaptados ao ambiente de criação, resultando em melhores ganhos de desempenho e menores custos de produção.

Do ponto de vista econômico, a reprodução é um dos principais focos da pecuária moderna. Portanto, estratégias que proporcionem melhorias na eficiência reprodutiva do plantel devem ser uma das metas mais relevantes no programa reprodutivo. Neste contexto, a utilização de biotécnicas reprodutivas representa uma alternativa altamente efetiva para aumentar os índices zootécnicos de um rebanho bovino (RUBIN, 2006).

Técnicas como Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras biotécnicas, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem contribuído para acelerar o melhoramento genético, ao utilizar animais provados e com características desejáveis e superiores (SANTOS et.al., 2010).

Apesar dos benefícios das diversas biotecnias disponíveis, a sincronização de estro/ovulação e a inseminação artificial (IA) continuam sendo as tecnologias mais influentes disponíveis para os produtores de bovinos para o melhoramento genético e o manejo reprodutivo. Os protocolos de Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) eliminam a necessidade de detectar o estro e permite a inseminação de novilhas e vacas em momento pré-determinado. Além disso, os protocolos de IATF aumentam a proporção de novilhas e vacas que concebem no início da estação de monta, fator importante para a melhoria da eficiência reprodutiva em um rebanho.

## 2.1 PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES HORMONAIIS PARA PROGRAMAS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

O desenvolvimento folicular é um processo dinâmico nos bovinos, sendo que todos os estágios de desenvolvimento folicular poderão estar presentes em um rebanho, durante um determinado momento. Portanto, para se aplicar um programa de sincronização da ovulação, o processo de desenvolvimento folicular precisa ser regulado em cada vaca individualmente, e coordenado em todas as vacas ao mesmo tempo.

Ao longo da última década, muitas estratégias farmacológicas têm sido propostas para melhorias dos protocolos de IATF, as quais têm facilitado o emprego da IATF e melhorado a eficiência reprodutiva. Apesar disso, a busca por alternativas que resultem em melhor fertilidade de fêmeas bovinas submetidas à IATF, ainda é constante no sentido de otimizar e maximizar o uso dessa biotecnologia em programas reprodutivos na pecuária de corte. Neste contexto, ajustes nos protocolos, mudanças nos horários de aplicação de fármacos e/ou momento da inseminação e até mesmo o desenvolvimento de novas formulações hormonais podem ser alternativas para se obter incrementos nas taxas de gestação após a IATF em vacas de corte.

Para um protocolo de sincronização ser eficiente ele deve reunir os seguintes processos fisiológicos: 1) sincronização das ondas foliculares após estímulo ovulatório (injeção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina - GnRH) ou atresia do folículo dominante (administração de estradiol e P4), que culminam no desenvolvimento de um folículo dominante fisiologicamente maduro no momento da inseminação; 2) controle do tempo de vida do corpo lúteo (CL) pela luteólise induzida pela prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ); e 3) Ovulação de um folículo dominante fisiologicamente maduro induzida por GnRH, Benzoato de Estradiol (BE) ou Cipionato de Estradiol (CE)

Os agentes farmacológicos utilizados nos protocolos de IATF e que estão disponíveis para uso no mercado brasileiro são: GnRH, prostaglandinas (naturais e sintéticas), ésteres de estradiol (BE, CE e Valerato de Estradiol - VE), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a P4 (na forma de dispositivo de silicone auricular ou intravaginal e formulação de P4 para uso oral).

A P4 é o hormônio predominante durante a fase lútea do ciclo estral, sendo responsável por regular a secreção do GnRH pelo hipotálamo. O GnRH atua como fonte hormonal responsável pela secreção do FSH e LH na hipófise anterior. O FSH é responsável pelo recrutamento de folículos e o LH leva aos estágios finais de crescimento folicular, maturação oocitária, além de promover a produção e secreção de estradiol pelo folículo dominante (SCHALLENBERGER et al., 1984; GINTHER et al., 2000).

No início do protocolo hormonal para sincronização da ovulação, uma fonte de P4 é frequentemente associada com uma fonte de estrógeno com a finalidade de sincronizar a onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2010). Entretanto, Bó, Baruselli e Martinez (2003) verificaram que as concentrações séricas de P4 antes da ovulação suprimem a frequência do pulso de LH, podendo afetar a maturação do oócito, o crescimento folicular e a produção de estradiol.

Além disso, a probabilidade de concepção após a inseminação está positivamente associada com a concentração sérica de P4, sete dias depois da IATF (MARTINS et al., 2014). Em novilhas, por exemplo, os mesmos autores relataram que baixas doses de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação apresentam concentração séricas de P4 mais elevadas no sétimo dia após a IATF.

Durante o protocolo de IATF em novilhas tratadas com baixos níveis de P4 em comparação com aquelas tratadas com níveis mais elevados, observaram que novilhas tratadas com baixa P4 tiveram folículo de maior diâmetro na IATF e melhores taxas de detecção de estro e de ovulação após a remoção do dispositivo intravaginal. Isso se deve aos efeitos negativos da alta concentração de P4 sobre o crescimento do folículo durante o tratamento hormonal, o que reduz o estradiol pré-ovulatório e a P4 após a ovulação, especificamente em novilhas Nelore. Adicionalmente, vacas que foram induzidas a ovularem um folículo maior tiveram maior concentração sérica de P4 após a inseminação (PERRY et al., 2007).

## 2.2 DESAFIOS NO PÓS-PARTO DA FÊMEA BOVINA: NUTRIÇÃO E CICLICIDADE

Uma grande proporção das vacas de corte zebuínas apresenta um período de ausência de ciclicidade reprodutiva (anestro) nos primeiros 45 dias após o parto (BEAL; GOOD; PETERSON, 1984; WHITTIER et al., 2013). Neste período de anestro, menores taxas de concepção serão alcançadas se as fêmeas não forem manejadas ou tratadas de forma adequada (BEAL; GOOD; PETERSON, 1984; WHITTIER et al., 2013).

O período de anestro em vacas recém-paridas é caracterizado por ausência de ovulações em períodos regulares, principalmente pela baixa secreção de pulsos de LH, o que dificulta o crescimento, maturação e ovulação do folículo dominante. (YAVAS; WALTON, 2000; CROWE, 2008). De maneira geral, esse período ocorre logo após o parto, mas em algumas vacas, isso pode se estender durante os três primeiros meses de lactação e até mesmo até o meio da lactação, como no caso de vacas com cistos foliculares. O atraso na atividade cíclica pode acarretar em perdas no desempenho reprodutivo já que essas vacas não apresentam cio e, conseqüentemente, não são inseminadas.

Uma das principais características para o prolongamento do anestro no pós-parto é a ausência ou a exposição a baixas concentrações de P4, o que compromete um bloqueio eficiente das secreções de LH, resultando em menor crescimento do folículo ovulatório, influenciando a capacidade do endométrio em liberar PGF<sub>2α</sub> mais precocemente, e aumentando a incidência de fases lúteas mais curtas.

Em contrapartida, a P4 é considerada um componente central da maior parte dos programas de sincronização da ovulação em bovinos. Além disso, é válido ressaltar que após a realização de um protocolo de IATF, mesmo havendo falha na concepção, as vacas se beneficiam do protocolo hormonal para o retorno regular da atividade ovarina, tirando as mesmas do período de anestro.

Muitos são os fatores que acentuam o quadro de anestro no pós-parto, entre eles destacam-se o estado nutricional, o escore de condição corporal, perda de peso no início da lactação, o número de partições (primíparas *versus* múltípara), a época do ano em que ocorre o parto e a ocorrência de doenças no pós-parto.

A nutrição é um aspecto de extrema importância para manutenção das funções metabólicas do organismo e no processo reprodutivo, seja pela secreção hormonal ou de fatores de crescimento e/ou constituintes bioquímicos, em todas as espécies (ROBINSON, 1996). De acordo com Sgorlon et al. (2008), variações nutricionais podem afetar o metabolismo diretamente, por determinar o substrato exógeno para processos celulares e, indiretamente por meio da estimulação ou inibição de fatores neuroendócrinos de regulação metabólica.

Adicionalmente, a resposta neuroendócrina pode ser refletida nas concentrações hormonais e de nutrientes no plasma sanguíneo, pois afeta muitos aspectos do desempenho reprodutivo em ruminantes, tais como idade à puberdade em ambos os sexos, a taxa de fertilidade e de ovulação (JORRITSMA et al., 2004; CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ et al., 2007), a sobrevivência embrionária, o parto, o intervalo entre partos, o desenvolvimento testicular e produção de espermatozoides (BLACHE et al., 2000; WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007).

A influência nutricional sobre o desempenho reprodutivo é um aspecto muito bem conhecido (MAURASSE; MATTON; DUFOUR, 1985; ROBINSON, 1996), havendo uma relação íntima entre a fertilidade, a condição corporal e o estado nutricional nas fêmeas ruminantes. Sabe-se também que a prática do “*flushing*” (incremento nutricional por curtos períodos antes da monta) tem sido empregada, especialmente para animais com baixa condição corporal, com a finalidade de aumentar a fertilidade devido a melhorias no desenvolvimento de folículos ovarianos e diminuição da porcentagem de folículos atrésicos.

Stagg et al. (1995) avaliaram o padrão de crescimento folicular em vacas de corte, em dietas com níveis de energia alto ou manutenção (150 e 100% dos requisitos ARC 1980, respectivamente) e concluíram que o anestro prolongado em vacas de corte, ocorre por falha de ovulação do folículo dominante, ao invés de falha em seu desenvolvimento. A associação entre anestro e LH foi estudada também por Richards, Wettemann e Schoenemann (1989) que verificaram uma associação do anestro com o decréscimo na frequência de pulsos de LH e por Rhodes, Entwistle e Kinder (1996) que observaram concentração média de LH, diâmetro do folículo dominante e concentração de estradiol menores ao se comparar ciclo estral anovulatório *versus* normal, em novilhas submetidas à restrição alimentar.

Willians et al. (1983) também verificaram um aumento no número de pulsos de LH em vacas que sofreram remoção de bezerros por 48 horas ( $3,0 \pm 0,6$  versus  $1,2 \pm 0,3$  pulsos em 6 horas) em animais que não sofreram a remoção de bezerros.

### 2.3 P4 INJETÁVEL E SEU USO NOS PROTOCOLOS DE IATF

Além dos protocolos que envolvem associação com P4, outros protocolos de IATF a base de GnRH e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Ovsynch) tem sido utilizado tanto em gado do corte quanto de leite. Fernandes (1998) verificou que a utilização do protocolo de GnRH -  $\text{PGF}_{2\alpha}$  - GnRH e GnRH -  $\text{PGF}_{2\alpha}$  - BE em vacas Nelore em anestro, resultou em taxas de prenhez inferiores (15 a 19%) aos animais que estavam ciclando antes do tratamento (45%). Entretanto, Vasconcelos (1998) encontrou maior taxa de sincronização após a segunda aplicação de GnRH em vacas que haviam respondido à primeira aplicação de GnRH do protocolo “Ovsynch” (92% na presença de ovulação e 79% na ausência), mostrando a importância da resposta ao primeiro GnRH no resultado final de sincronização. Isso ocorre porque em torno do quarto dia após a ovulação, quando o folículo dominante apresenta por volta de 10 mm de diâmetro, ocorre a transição da dependência do FSH para LH (GINTHER et al., 1996) e este estágio é crítico para continuar o crescimento do folículo dominante.

Jolly et al. (1994) observaram que o LH estimula AMPc em células da granulosa somente em folículos com mais de 9 mm de diâmetro, o que é consistente com o fato de que folículos maiores que 9 mm adquirem receptores para LH e capacidade ovulatória. Murphy et al. (1991) verificaram que após a divergência dos folículos, se ocorresse baixa pulsatilidade de LH, ocorria a atresia do folículo dominante e aumento do número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral.

Apesar de resultados promissores com os protocolos envolvendo GnRH, a grande maioria das sincronizações envolvem uma fonte de P4 como principal base hormonal. Um estudo recente (PUGLIESI et al., 2015) avaliou o impacto da administração de uma formulação de P4 injetável de longa ação no dia quatro após a IATF sobre a fertilidade de vacas de corte em anestro, e observou que

a taxa de prenhez foi maior nas vacas do grupo tratada com 150 mg de P4 injetável de longa ação por via intramuscular.

Atualmente existem produtos eficientes que liberam P4 (dispositivos intravaginais ou implante auricular) com a finalidade de sincronizar o estro e/ou a ovulação. Estes produtos são utilizados por um período de 8 a 9 dias, dependendo do protocolo estabelecido, em que altos níveis de P4 devem ser mantidos para suprimir a liberação endógena do LH, simulando a fase luteínica do ciclo estral. A regressão luteínica é alcançada pela aplicação de estradiol no início do tratamento ou pela administração de PGF<sub>2α</sub> no momento da remoção da fonte de P4.

A P4 tem efeito dose-dependente sobre a secreção de LH (KINDER et al., 1996). Kojima et al. (1992) demonstraram que a administração e doses subluteais de P4 exógena na ausência de CL resulta em um padrão de secreção de LH semelhante ao que se verifica na fase folicular em bovinos. No entanto, as concentrações ideais de P4 necessárias para estimular a fertilidade parecem variar entre as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus*, assim como entre bovinos de leite e corte.

A alteração da regulação da liberação de LH pela P4 pode afetar o desenvolvimento e a capacidade do oócito de ser fertilizado. Quando o período de exposição às concentrações subluteais de P4 é muito prolongado, folículos persistentes se desenvolvem, com drástica redução da fertilidade (KINDER et al., 1996). Entretanto, a influência de períodos limitados de baixas concentrações de P4 sobre a secreção de LH, o crescimento folicular, a competência do oócito e a fertilidade ainda não foi determinada. Com a exceção de estudos que investigaram a relação entre a ocorrência de folículos persistentes e a infertilidade, poucos estudos avaliaram diretamente os efeitos das concentrações de P4 e das concentrações subsequentes de LH durante o desenvolvimento da onda folicular sobre a qualidade do oócito cuja ovulação foi induzida e sobre a prenhez.

Existem poucas informações a respeito do uso parenteral de P4 injetável de longa ação em protocolos de sincronização da ovulação e seus efeitos nos níveis plasmáticos de P4 na espécie bovina (FERNÁNDEZ; SALAZAR, 2007).

O comportamento da dinâmica folicular ovariana em vacas *Bos taurus indicus* (Nelore) submetidas à sincronização da ovulação com P4 injetável versus dispositivo intravaginal foi investigado em dois estudos (MOROTTI et al., 2013, MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013), os quais revelaram algumas

características foliculares semelhantes entre os grupos sincronizados com injeção intramuscular e dispositivo intravaginal de P4.

Apesar das semelhanças com alguns parâmetros de dinâmica folicular, Morotti et al. (2013) revelaram que o grupo que recebeu a P4 injetável apresentou menor taxa de ovulação, possivelmente devido ao reduzido tempo de metabolismo da P4 aplicada por via parenteral.

Em outro estudo Morotti, Campos e Seneda (2013) verificaram a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a sincronização com 350 mg de P4 e 2 mg de BE no D0, 500 µg de cloprostenol e 300 UI de eCG no D6, 1 mg de BE no D7 e IATF 24h depois *versus* protocolo convencional com dispositivo intravaginal de P4. Neste estudo, maior taxa de prenhez foi observada no grupo com dispositivo intravaginal com 1 g de P4 (45,2%; 10/22) do que no grupo que recebeu 350 mg de P4 injetável (18,1%; 22/04 ; P = 0,050). Uma possível explicação para essa menor fertilidade pode ser o menor diâmetro do folículo ovulatório em animais que receberam a P4 injetável. No entanto, o pequeno número de animais deste estudo (n = 44) torna limitada a avaliação da taxa de prenhez. Além disso, vale ressaltar que o protocolo com P4 injetável eram 2 dias mais curto que o protocolo convencional, o que determinou um menor tempo de crescimento folicular para o grupo injetável.

Considerando os benefícios práticos que a P4 injetável poderiam proporcionar aos programas de sincronização da ovulação em bovinos e o limitado número de estudos sobre este assunto, toda investigação acerca desse fará necessário no sentido de agregar conhecimento sobre esta fonte hormonal. Não há estudos sobre a capacidade de metabolização da P4 injetável, bem como estudos sobre a taxa de prenhez em lotes com diferentes categorias e/ou com elevado números de animais.

## **4 HIPÓTESE**

A progesterona injetável de longa ação é tão eficiente quanto a progesterona de implantes intravaginais em protocolos de IATF.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Contribuir para um maior conhecimento do uso da progesterona injetável nos protocolos de IATF de vacas Nelore por meio da avaliação da taxa de prenhez.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Comparar a taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes e não lactantes sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável e o dispositivo intravaginal de progesterona
- b) Estabelecer melhor momento para a IA em protocolos de progesterona injetável.

## **6 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

### **6.1 ARTIGO A**

**Avaliação da taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes e não lactantes submetidas à inseminação artificial em tempo-fixo a base de progesterona injetável**

Artigo submetido à Revista Semina: Ciências Agrárias, em 30 de novembro de 2015.



37 parenteral. O efeito da P4 injetável no controle da dinâmica folicular em bovinos tem  
38 sido pouco estudado, e até o momento, não há estudos que investigaram o efeito da  
39 P4 injetável na fertilidade de vacas submetidas à IATF. O objetivo do presente  
40 estudo foi avaliar a taxa de prenhez de vacas Nelore em lactação e não lactantes,  
41 submetidas a um protocolo de IATF a base de P4 injetável. Neste estudo, foi  
42 demonstrado que das 422 vacas não lactantes, 162 (38,3%) tornaram-se gestantes  
43 60 dias após a IATF. No lote de vacas lactantes (N = 516), 166 (32,1%) estavam  
44 prenhes após a sincronização com protocolo hormonal à base de P4 injetável. A  
45 proporção de vacas gestantes lactantes e não lactantes foram comparadas pelo  
46 teste do Qui-Quadrado adotando nível de significância quando  $p < 0,05$ . A taxa de  
47 prenhez de vacas submetidas à IATF com P4 injetável foi influenciada pelo status  
48 lactacional. Vacas lactantes apresentaram menor desempenho reprodutivo,  
49 possivelmente devido a maior exigência nutricional. No entanto, o uso da P4  
50 injetável mostrou resultados promissores, podendo ser uma estratégia interessante  
51 em rebanhos em larga escala.

52 **Palavras-chave:** Progesterona Injetável. Vacas lactante. Vacas não lactante.  
53 Sincronização da ovulação. Taxa de prenhez.

54

## 55 Introduction

56 Improvements in reproductive efficiency are strategically important in  
57 managing cattle productivity. Of several such strategies that have recently been  
58 employed in the optimization of cattle reproduction, synchronization of ovulation  
59 stands out as one of the most notable techniques, used to optimize the reproductive  
60 management in cattle, owing to improvements in pregnancy rate and genetic gain.  
61 The benefits of artificial insemination (AI) are already well known and this technique  
62 certainly provides several improvements in the herd. However, one of the main  
63 advantages of AI is directly linked to the genetic improvement of livestock and  
64 obtaining animals with greater potential for production and reproduction (LAMB et al.,  
65 2010).

66 In an ovulation synchronization program in beef cattle, approximately 40–60%  
67 of cows subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI) became pregnant after a  
68 single insemination procedure. However, this pregnancy rate may vary owing to  
69 variability between individual animals and animal categories, as well as in factors  
70 such as sanitary and nutritional management, body condition scores (BCS), the  
71 postpartum period and hormonal treatments (BARUSELLI et al., 2002, 2004).

72 Most current FTAI protocols in cattle use progesterone (P4) as their hormonal  
73 basis for synchronization of estrus. P4 has long been known to bring about  
74 synchronization in bovine estrus (LAMOND, 1964; GORDON, 1976), and it can be

75 administered through a variety of routes, including intravaginal devices and ear  
76 implants, and even orally. In FTAI protocols, P4 promotes estrus synchronization by  
77 ovulation supplementing or replacing endogenous P4, thus simulating the action of a  
78 corpus luteum (BARUSELLI et al., 2004).

79 Commercial formulations containing P4 or progestagen prevented the  
80 manifestation of estrus during the treatment period and exerted a negative feedback  
81 effect on the endogenous peak of luteinizing hormone (LH), thus blocking the  
82 ovulation of the dominant follicle (DF) (SAVIO et al., 1993; STOCK; FORTUNE,  
83 1993). When combined with a source of estrogen at the beginning of the treatment,  
84 P4 promotes regression of the DF, which is dependent on LH for growth. Estrogen  
85 also causes atresia of small follicles, whose growth is dependent on follicle  
86 stimulating hormone (FSH). As a result, this hormonal combination promotes  
87 synchronized emergence of a new wave of follicular growth approximately 3 to 4  
88 days after the initiation of treatment (BARUSELLI et al., 2004).

89 The use of an injectable P4 source would be an interesting pharmacological  
90 strategy to control the estrus cycle, bringing with it a number of potential advantages.  
91 Parenteral administration is a very practical method, owing to reduced management  
92 demands and greater flexibility when used on a large scale. Using an injectable form  
93 would lead to lower P4 production costs by dispensing with the silicone and other  
94 materials used in the manufacture of devices and/or implants. A reduction in the risk  
95 of health problems associated with intravaginal devices (such as device loss and the  
96 occurrence of vaginitis and/or vulvovaginitis) has also been cited as a benefit of  
97 injectable P4 (MOROTTI et al., 2013, MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013). In  
98 addition, the injectable P4 would be an interesting alternative to be employed in FTAI  
99 protocols, as well as other reproductive biotechnologies.

100 Very few studies have characterized the effects of injectable P4 in control of  
101 the estrus cycle (ULBERG; LINDLEY, 1960; FIKE et al., 1999) and no studies exist,  
102 to date, that have investigated its effect on the fertility of cows undergoing FTAI.  
103 However, two recent studies investigated the ovarian follicular dynamics of *Bos*  
104 *taurus indicus* (Nelore) cows in which synchronization of ovulation was brought about  
105 by treatment with P4 via intramuscular (IM) injection versus an intravaginal device  
106 (MOROTTI et al., 2013; MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013) and similarities were  
107 observed between the follicular characteristics in the two groups.

108 The aim of the present study was to evaluate the pregnancy rate of both  
109 lactating and non-lactating Nelore cows undergoing FTAI using an injectable P4  
110 protocol

111

## 112 **Materials and Methods**

### 113 *Site, animals, and feed management*

114 This study was conducted according to the standards of the Ethics Committee  
115 for Animal Experimentation of the State University of Londrina based on Federal Law  
116 11.794 of 08 October 2008.

117 The experiment was conducted at a farm in South America (latitude 23° 24'  
118 23" and longitude 57° 26' 4") during the breeding season, from November 2013 to  
119 January 2014. The climate is tropical, with an average temperature of 24°C, and the  
120 rainy season extends from November to January.

121 For this study, 938 multiparous Nelore cows (*Bos taurus indicus*), aged  
122 between 48 and 120 months and with body condition scores (BCS) between 2.5 and  
123 4.0 (on a scale of 0 to 5) (AYRES et al., 2009), were used. During the experimental  
124 period, the cows were maintained by continuous grazing on *Brachiaria brizantha* and  
125 *Brachiaria humindícula*. They were given access to mineralized salt and water *ad*  
126 *libitum*.

127

### 128 *Experimental design and treatments*

129 The animals were separated into 2 groups: non-lactating cows (n = 422; BCS  
130 = 3.0–4.0) and lactating cows (n = 516; BCS = 2.5–3.0) from 30 to 45 days  
131 postpartum. In a random day of estrus (day 0), both groups were subjected to the  
132 same FTAI hormone protocol, using a source of injectable P4 in an oily vehicle.

133 The ovulation synchronization protocol was performed with IM injection of 250  
134 mg of injectable P4 (Progessincro, Campos Laboratory Ltda, Londrina, Brazil) in  
135 combination with 2 mg of estradiol benzoate (EB) at day 0 (D0). At day 7 (D7), the  
136 animals received IM 500 µg of cloprostenol (PGF2α; Cyclase® DL, Syntex, Buenos  
137 Aires, Argentina). On day 8 (D8), 300 IU equine chorionic gonadotropin (eCG;  
138 Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and 1 mg of estradiol benzoate were  
139 administered IM (EB; Cipiosyn®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and FTAI was  
140 performed 36 hours after the D8 application of EB (at day 9; Figure 1). Insemination

141 was performed by the same trained inseminator using conventional semen thawed in  
142 a water bath at 35–37°C for 30 seconds.

143 Pregnancy diagnosis was performed 60 days after FTAI by transrectal  
144 ultrasonography (model SSD- 500, equipped with a 5 MHz linear transducer, Aloka,  
145 Tokyo, Japan).

146

#### 147 *Parameters evaluated and statistical analyses*

148 The groups were evaluated for pregnancy occurrence 60 days after FTAI was  
149 performed. The proportion of lactating and non-lactating pregnant cows was  
150 compared using the chi-square test in Minitab - Statistical Analysis Software adopting  
151 a significance level of  $P < 0.05$ .

152

### 153 **Results and Discussion**

154 To our knowledge, this is the first study to evaluate the pregnancy rate for  
155 FTAI in Nelore cows using an injectable P4 source (with single application in D0). It  
156 may assist the extension of this information base to other studies of control of estrus  
157 in cattle, since data on the use of injectable P4 is very limited in the existing  
158 literature.

159 In the present study, it was demonstrated that, out of 422 non-lactating cows,  
160 162 become pregnant within 60 days after FTAI, which equated to a 38.3%  
161 pregnancy rate. In lactating cows ( $n = 516$ ), 166 were pregnant after the hormonal  
162 protocol with injectable P4, giving a pregnancy rate of 32.1%. The pregnancy rate in  
163 non-lactating cows was higher than that in the lactating group ( $p = 0.047$ ; Table 1)  
164 and it is possible that cyclicity and the BCS of the non-lactating females were the  
165 main factors contributing to the difference in fertility between the two groups of  
166 females synchronized with injectable P4.

167 The effects of nutrition on the pregnancy rate of Nelore cows subjected to  
168 FTAI programs have been shown in other studies. In a study conducted by Ferreira  
169 et al. (2013), pregnancy rates of 86.5% ( $BCS \geq 3 \leq 4$ ) and 65.9% ( $BCS \geq 2.0 \leq 2.5$ )  
170 were achieved when comparing two groups of animals with different BCS ranges.  
171 The evaluation of the BCS is a widely used tool in routine reproductive management  
172 of cattle, and is a fast and reliable way to assess the nutritional status of the herd.  
173 The BCS allows predictions to be made about the response of a group of cattle to a  
174 hormonal protocol and, consequently, the expected pregnancy rate (FERREIRA et

175 al., 2013). In this context, data found in the existing literature supports the results of  
176 the comparison between our two experimental groups. Non-lactating cows that were  
177 cycling showed a higher pregnancy rate, possibly the largest BCS. This result is to be  
178 expected since the lactating cows are experiencing a higher nutritional challenge as  
179 a consequence of maintaining their calves.

180 The use of injectable P4 is an interesting advance for pharmacological estrus  
181 control and has a number of advantages over other devices and implants used for P4  
182 delivery. These include the greater practicality of parenteral administration and  
183 increased flexibility when used on a large scale. The use of injectable P4 in a single  
184 application facilitates the management of animals and reduces the labor and costs  
185 associated with hormone treatment and intravaginal P4 devices (MOROTTI et al.,  
186 2013, MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013). Such devices are labor intensive,  
187 since they require sanitization for adequate storage and re-use. Additionally, the use  
188 of injectable P4 eliminates the risk of vulvovaginitis, by removing the need for  
189 handling and the potential for intravaginal contamination.

190 Morotti, Campos e Seneda (2013) showed some similarities between the  
191 ovarian follicular dynamics in Nelore cows subjected to an FTAI protocol using either  
192 injectable P4 or an intravaginal device. However, the group receiving the injected P4  
193 exhibited a lower ovulation rate, possibly because of the metabolism of the injected  
194 P4. In the same study, the authors found that the pregnancy rate was also higher in  
195 the group of cows synchronized using intravaginal devices (45.4%; 10/22) compared  
196 to those treated with injectable P4 (18.1%; 4/22,  $P = 0.05$ ), but the small number of  
197 animals used ( $n = 44$ ) limits the usefulness of this study in evaluating pregnancy  
198 rates. In the present study, both lactating and non-lactating cows had pregnancy  
199 rates higher than those reported by Morotti, Campos e Seneda (2013). It should also  
200 be highlighted that the protocol used in the present study has undergone minor  
201 adjustments based on unpublished studies within our research group (MOROTTI et  
202 al., 2013; MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013; CAMPOS et al., 2013).

203 Ulberg and Lindley (1960) observed that there was no evidence of a marked  
204 reduction in fertilization rate using daily P4 injections. These same researchers also  
205 found that the heifers treated with P4 injections in the absence of any other drug  
206 showed higher pregnancy rates (68%; 15/22) than either the control group that was  
207 not treated with hormones (50%; 11/22) or a third group of heifers that received  
208 injections of P4 associated with estrogen (61%; 14/23).

209 The present study demonstrated that it is possible to achieve acceptable  
210 pregnancy rates using an FTAI protocol with injectable P4. Using a protocol of  
211 synchronization and resynchronization of ovulation, Marques et al. (2015) observed a  
212 55% pregnancy rate in the first FTAI (synchronization) and 80.6% 30 days after the  
213 second FTAI (resynchronization). P4 was administered using a traditional  
214 intravaginal device (P4 + EB on D0, removal of the implant + administration of 250  
215 µg of PGF2α + 300 IU eCG + EC D8; insemination of animals 48 hours after removal  
216 of the implants) and the study compared heifers, primiparous and multiparous cows  
217 lactating. These results were very similar to those observed by Campos et al. (2013),  
218 who obtained conception rates ranging from 47 to 54% after the first FTAI in  
219 multiparous Nelore cows.

220 The results of the present experiment suggest that both the animal category  
221 and the BCS have an influence on the pregnancy rate of Nelore cows when using  
222 injectable P4. Despite the lower pregnancy rates when compared with conventional  
223 P4 protocols (implants and devices), injectable P4 showed promising results, and  
224 may be an interesting strategy for FTAI in large-scale livestock production owing to  
225 the low handling costs, simplicity of management and reduction in associated labor.

226

## 227 **Conclusion**

228 This was the first study that used an injectable P4 source as the hormonal  
229 basis for large-scale FTAI. It was found that the pregnancy rate of cows subjected to  
230 FTAI with injectable P4 was influenced by their lactation status, with the lowest  
231 reproductive performance occurring in lactating cows, possibly owing to their lower  
232 BCS.

233

## 234 **References**

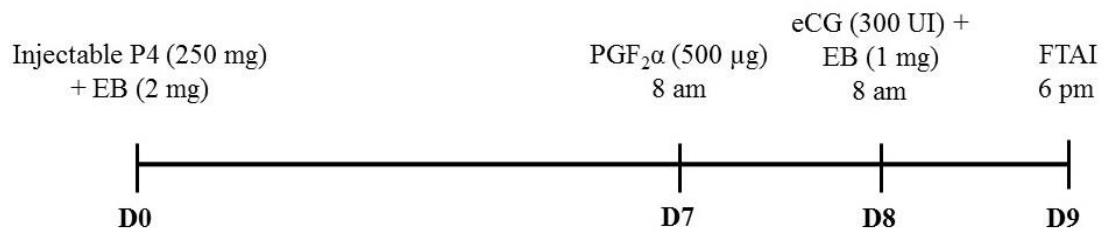
235 AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.;  
236 LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of  
237 subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Science*, Amsterdam, v.  
238 123, n. 2-3, p. 175-179, 2009.

239 BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.;  
240 CAMPOS FILHO, E. P. Effect of different treatments for timed artificial insemination  
241 on the reproductive efficiency in lactating beef cows. *Revista Brasileira de*  
242 *Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.

- 243 BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The  
244 use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef  
245 cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 82-83, p.  
246 479-486, 2004.
- 247 CAMPOS, J. T.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; MOROTTI, F.; SENEDA,  
248 M. M. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in  
249 lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, New York, v. 80, n. 6, p. 619-623, 2013.
- 250 FERREIRA, M. C. N.; MIRANDA, R.; FIGUEIREDO, M. A.; COSTA, O. M.;  
251 PALHANO, H. B. Impacto da condição corporal sobre a taxa de prenhez de vacas da  
252 raça Nelore sob regime de pasto em programa de inseminação artificial em tempo  
253 fixo (IATF). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1861-1868, 2013.
- 254 FIKE, K. E.; WEHRMAN, M. E.; LINDSEY, B. R.; BERGFELD, G.; MELVIN, E. J.;  
255 QUINTAL, J. A.; ZANELLA, E. L.; KOJIMA, F. N.; KINDER, J. E. Estrus  
256 synchronization of beef cattle with a combination of melengestrol acetate and an  
257 injection of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol. *Journal of Animal Science*, Champaign,  
258 v. 77, n. 3, p. 715-723, 1999.
- 259 GORDON, I. Controlled breeding in cattle. Part 1: hormone in the regulation of  
260 reproduction, oestrus, control, and set time artificial insemination. *Journal of Animal*  
261 *Breeding and Genetics*, United Kingdom, v. 44, p. 265- 275, 1976.
- 262 LAMB, G. C.; DAHLEN, C. R.; LARSON, J. E.; MARQUEZINI, G.; STEVENSON, J.  
263 S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination  
264 in beef cattle: a review. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 88, n. E. Suppl.,  
265 p. 181-192, 2010.
- 266 LAMOND, D. R. Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. *Journal of*  
267 *Animal Breeding and Genetics*, United Kingdom, v. 32, n. 3, p. 269-285, 1964.
- 268 MARQUES, M. O.; MOROTTI, F.; SILVA, C. B.; RIBEIRO, M. J.; SILVA, R. C. P.;  
269 BARUSELLI, P. S.; SENEDA, M. M. Influence of category - heifers, primiparous and  
270 multiparous lactating cows - in a large-scale resynchronization FTAI program.  
271 *Journal of Veterinary Science*, Gwanak-gu, v. 16, n. 3, p. 367-371, 2015.
- 272 MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; OLIVEIRA, E. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular  
273 dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial  
274 insemination protocol with injectable progesterone. *Semina: Ciências Agrárias*,  
275 Londrina, v. 34, n. 6, p. 3865-3872, 2013.
- 276 MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination  
277 using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of  
278 Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. *Semina: Ciências*  
279 *Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3873-3882, 2013.
- 280 SAVIO, J. D.; TATCHER, W. W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; WOLFENSON,  
281 D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal*  
282 *of Reproduction and Fertility*, United Kingdom, v. 97, n. 1, p. 197-203, 1993.

- 283 STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship  
284 between prolonged growth and the ovulatory follicle and endocrine parameters.  
285 *Endocrinology*, Washington, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- 286 ULBERG, L. C.; LINDLEY, C. E. Use of Progesterone and Estrogen in the Control of  
287 Reproductive Activities in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 19,  
288 n. 4, p. 1132-1142, 1960.
- 289

290 **Figure 1.** Schematic representation of the FTAI protocol with injectable progesterone  
 291 used for synchronization in Nelore cows.



292

293 **Source:** Elaboration of the authors.

294 P4 – Progesterone (a single parenteral application on D0). EB – Estradiol Benzoate. PGF<sub>2</sub>α –  
 295 Cloprostenol. eCG – Equine chorionic gonadotropin.  
 296

297 **Table 1.** Pregnancy rates of lactating and non-lactating Nelore cows subjected to  
 298 FTAI protocol with injectable progesterone

<b>Animal Category</b>	<b>No. of animals (n)</b>	<b>No. of pregnant (n)</b>	<b>Pregnancy rate (%)</b>
Non-lactating cows	422	162	38.3a
Lactating cows	516	166	32.1b
<b>Total</b>	<b>938</b>	<b>328</b>	<b>35.2</b>

299

300 **Source:** Elaboration of the authors.

301 Values with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

302

## 6.2 ARTIGO B

**Avaliação da taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à  
sincronização da ovulação com diferentes protocolos a base de progesterona  
injetável ou dispositivo intravaginal**

Artigo submetido à Revista Semina: Ciências Agrárias, em 30 de novembro de 2015.

2           **Avaliação da taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à**  
3           **sincronização da ovulação com diferentes protocolos a base de progesterona**  
4           **injetável ou dispositivo intravaginal**

5  
6           Evaluation of pregnancy rates of *Bos indicus* cows subjected to different  
7           synchronization ovulation protocols using injectable progesterone or an intravaginal  
8           device

9  
10          Jefferson Tadeu Campos<sup>1</sup>, Fábio Morotti<sup>1</sup>, Camila Bortoliero Costa<sup>1</sup>, Larissa  
11          Zamparone Bergamo<sup>1</sup>, Marcelo Marcondes Seneda<sup>2\*</sup>

12  
13       **Abstract**

14       This study evaluated the pregnancy rate in Nelore cows (*Bos indicus*) that were  
15       subjected to fixed- time artificial insemination (FTAI) using different protocols  
16       consisting of injectable progesterone (P4) or an intravaginal device (impregnated  
17       with P4). Multiparous cows 72–84 months in age, 30–45 days postpartum, were  
18       selected on the basis of the absence of a corpus luteum (CL) and follicles <8 mm  
19       after transrectal palpation and ultrasound examinations. On a random day of the  
20       estrus cycle (D0), the selected animals (n = 135) were randomly assigned to one of  
21       three experimental groups (n = 45 each). Group I (injectable P4/FTAI 36 hours)  
22       received 250 mg of injectable P4 and 2 mg EB on D0; on D7, they received 500 µg  
23       of cloprostenol; on D8, 300 IU of eCG and 1 mg of EB were administered; and finally,  
24       FTAI was performed 36 hours after the application of EB. Group II (injectable  
25       P4/FTAI 48 hours) received the same protocol as Group I, except that the FTAI was  
26       performed 48 hours after ovulation induction. The animals of Group III (Control/CIDR)  
27       received a conventional protocol for FTAI using an intravaginal device (D0: P4 and 2  
28       mg EB; D8: device removal, 500 µg cloprostenol, 300 IU eCG, 1 mg EB; and FTAI  
29       performed 48 hours after removal of the device). The results showed that cows  
30       synchronized with the conventional protocol for FTAI (Control/CIDR) had a higher  
31       pregnancy rate (60 %, 27/45) than those synchronized with an injectable P4/FTAI 36  
32       hours (33.33 %; 15/45, P = 0.010). However, the group receiving injectable P4  
33       group/FTAI 48 hours had a similar pregnancy rate (48.9 %; 22/45; P = 0.290) when  
34       compared to both the group receiving the conventional protocol and that receiving  
35       injectable P4/FTAI 36 hours (P = 0.134). Although the injectable P4 may affect  
36       pregnancy rate with the FTAI performed in 36 hours, we found similar pregnancy  
37       rates from cows inseminated 48 hours after induction ovulation, considering

---

<sup>1</sup> Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: jcampos007@hotmail.com; fabiomorotti@hotmail.com; cbortoliero@gmail.com; larissabergamo1@hotmail.com

<sup>2</sup> Prof. Deptº de Clínicas Veterinárias, Laboratório de Reprodução Animal, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: mseneda@uel.br

\* Author for correspondence.

38 injectable or intravaginal P4. Therefore, we suggest that injectable P4 represents an  
39 alternative source of progesterone for synchronization of cattle for FTAI.

40 **Keywords:** FTAI. Nelore. Injectable progesterone. Pregnancy rate.

41

## 42 **Resumo**

43 Este estudo avaliou a taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a  
44 diferentes protocolos de IATF a base de progesterona (P4) injetável ou dispositivo  
45 intravaginal impregnado com P4. Vacas múltiparas entre 72 e 84 meses de idade,  
46 com 30 a 45 dias pós-parto foram previamente selecionadas com base na ausência  
47 de corpo lúteo (CL) e folículos < 8 mm após palpação e exame ultrassonográfico  
48 transretal. Em um dia aleatório do ciclo estral (D0), os animais selecionados (N =  
49 135) foram aleatoriamente distribuídos em um dos três grupos experimentais (n = 45  
50 / grupo). O grupo I (P4 injetável/IATF 36 horas) recebeu 250 mg de P4 injetável e 2  
51 mg BE no D0. No D7 aplicou-se 500 µg de Cloprostenol. No D8 300 UI de eCG e 1  
52 mg de BE foram administrados, sendo que a IATF foi realizada 36 horas após a  
53 aplicação do BE. O grupo II (P4 injetável/IATF 48 horas) recebeu o mesmo  
54 protocolo, exceto pela IATF que foi realizada 48 horas após indução da ovulação. Os  
55 animais do grupo III (Controle/CIDR) receberam um protocolo convencional de IATF  
56 com dispositivo intravaginal (D0 - P4 e 2 mg BE, D8 - remoção do dispositivo, 500 µg  
57 Cloprostenol, 300 UI eCG, 1 mg BE e IATF realizada 48 horas após a remoção dos  
58 dispositivos). Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado ( $p \leq 0,05$ ).  
59 No estudo, as vacas sincronizadas com protocolo convencional de IATF  
60 (Controle/CIDR) apresentaram maior taxa de prenhez (60%; 27/45) do que aquelas  
61 submetidas à sincronização da ovulação com P4 injetável/IATF 36 horas (33,33%;  
62 15/45;  $p = 0,01$ ). Porém, o grupo P4 injetável/IATF 48 horas demonstrou uma taxa  
63 de prenhez semelhante (48, 9%; 22/45;  $p = 0,290$ ) ao grupo com protocolo  
64 convencional e ao grupo de P4 Injetável/IATF 36 horas ( $p = 0,134$ ). Embora a P4  
65 injetável demonstrou afetar a taxa de prenhez com à IATF realizada em 36 horas,  
66 as vacas inseminadas 48 horas após a indução da ovulação apresentaram taxas  
67 semelhantes às vacas que receberam dispositivo intravaginal. Portanto, sugere-se a  
68 P4 injetável uma fonte progesterônica alternativa para sincronização da ovulação em  
69 vacas.

70 **Palavras-chave:** IATF. Nelore. Progesterona injetável. Taxa de prenhez.

71

## 72 **Introduction**

73 Knowledge of the physiology of the estrus cycle in cattle has been crucial for  
74 developing specific pharmacological strategies to control the stages of follicular  
75 development (i.e., recruitment, selection, growth, maturation, and ovulation). These  
76 advances have greatly enhanced the efficiency of reproductive biotechnologies,  
77 especially for implementing the synchronization of ovulation protocols that are now  
78 well established for cattle (BARUSELLI et al., 2004; MOROTTI et al., 2013).

79 Among the reproductive biotechnologies, artificial insemination (AI) is  
80 considered one of the most effective and low-cost strategies to achieve both genetic

81 improvement and to increase the reproductive efficiency of herds (PEGORER et al.,  
82 2011). Strategies to increase the productive and reproductive performance in  
83 domesticated animals are necessary to ensure livestock farming remains profitable  
84 and sustainable. However, key characteristics of reproduction have low heritability;  
85 they, therefore, can be strongly influenced by environmental factors, nutrition, health,  
86 and management (BARUSELLI et al., 2004).

87         Following the development of the first protocols for fixed-time artificial  
88 insemination (FTAI), a wide variety of protocols have been developed specifically for  
89 each female category, namely to minimize costs, the animals' management, and to  
90 attain maximum reproductive efficiency. Among the many programs for FTAI, those  
91 using hormonal treatment based on progesterone (P4) coupled to estrogen have  
92 shown more satisfactory results in the synchronization of the growth follicular wave  
93 (SÁ FILHO et al., 2011; SALES et al., 2012). The action of P4 is widely known to  
94 inhibit estrus behavior and to block ovulation of the dominant follicle (LAMOND,  
95 1964; GORDON, 1976; WHEATON; LAMB, 2007; QUEZADA-CASASOLA et al.,  
96 2014). In these protocols, P4 can be administered in different ways: via an ear  
97 implant, an intravaginal device, oral supplementation (BARUSELLI et al., 2004), or  
98 even as an injectable solution (MOROTTI et al., 2013; MOROTTI; CAMPOS;  
99 SENEDA, 2013).

100         Health benefits, reduced handling costs, and greater convenience in  
101 parenteral application have been reported in a study with injectable P4 that was  
102 conducted in beef cattle (MOROTTI et al., 2013). Despite these relative advantages,  
103 another study conducted by the same research group showed that cows  
104 synchronized with injectable P4 showed a lower pregnancy rate (27.0 %) than did  
105 those synchronized with an intravaginal device (45.5 %) (MOROTTI; CAMPOS;  
106 SENEDA, 2013). Although a few studies have been conducted using injectable P4,  
107 more knowledge of this strategy's pharmacological adjustments, changes in the  
108 management of animal, and/or synchronization protocols could improve fertility in  
109 cows when synchronized this way. Thus, the aim of this study was to evaluate in  
110 Nelore cows their pregnancy rate after FTAI under different protocols using injectable  
111 P4 or a conventional intravaginal device.

112

113

## 114 **Materials and Methods**

115           The study was conducted on a farm located in Brazil, South America (latitude  
116 23° 24' 23" 1 and longitude 57° 26' 4"), during the breeding season of November 2013  
117 to March 2014. The climate in this region is tropical, with an average daily  
118 temperature of 24°C, and a rainy season from November to January.

119           During the experimental period, the cows were maintained by continuous  
120 grazing of *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humindícula*. They were given access  
121 to mineralized salt and water *ad libitum*.

122

### 123 *Animal selection*

124           A total of 135 Nelore cows (*Bos indicus*) were first selected based on the  
125 absence of a corpus luteum (CL) and a follicle <8 mm, as determined by palpation  
126 and ultrasound transrectal examinations (Aloka SSD-500, Tokyo, Japan). All selected  
127 cows were lactating (30–45 days postpartum); multiparous at 72–84 months old; and  
128 had a body condition score (BCS) between 2.5 and 3.5, on a scale of 0 to 5 (AYRES  
129 et al., 2009), and an average weight ( $\pm$  SEM) of 410.3  $\pm$  47.5 kg.

130

### 131 *Experimental design*

132           On a random day of the estrus cycle (D0) the selected cows (n = 135) were  
133 randomly assigned to one of three experimental groups (n = 45 per group; Figure 1).  
134 The cows in Group I (P4 injectable/FTAI 36 hours) received an intramuscular (i.m.)  
135 dose of 250 mg of injectable P4 (Progressincro, Laboratory Campos Ltda, Londrina,  
136 Brazil), in association with 2 mg of estradiol benzoate (EB; Syntex®, Syntex, Buenos  
137 Aires, Argentina). On D7, the cows received an i.m. dose of 500  $\mu$ g of cloprostenol  
138 (PGF2 $\alpha$ ; Cyclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina); 24 hours later (D8), they  
139 received an i.m. dose of 1 mg of EB in addition to 300 IU of equine chorionic  
140 gonadotropin (eCG; Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). An FTAI was  
141 performed 36 hours after ovulation induction. For Group II (P4 injectable/FTAI 48  
142 hours), the protocol for the synchronization of ovulation was identical that of Group 1,  
143 except the FTAI was performed 48 hours after ovulation induction. The cows in  
144 Group III (Control/CIDR) received a conventional protocol for FTAI using an  
145 intravaginal device that delivered 1.9 g of P4 (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brazil)  
146 associated with an i.m. administered dose of 2 mg of EB. The device was removed  
147 on D8, followed by an i.m. dose of 500  $\mu$ g of cloprostenol, 300 IU of eCG, and 1 mg

148 of EC. An FTAI was performed 48 hours after device removal. The cows of the three  
149 groups were inseminated with frozen semen from the same bull, a single departure,  
150 and by the same inseminator.

151

### 152 *Statistical analyses*

153 The effects of the FTAI protocol on pregnancy rates of the three groups were  
154 analyzed by Chi-square tests. All of the data were analyzed using the Statistical  
155 Software Minitab, adopting a level of significance 5 %.

156

## 157 **Results and Discussion**

158 This study is one of the few to report on the use of injectable P4 in FTAI  
159 protocols applied to beef cows. Our research group has pioneered the evaluation of  
160 injectable P4 on the parameters of ovarian follicular dynamics (follicular growth rate,  
161 diameter of the dominant and ovulatory follicle, ovulation rate and CL diameter) and  
162 pregnancy rates of Nelore cows submitted to a synchronization of ovulation  
163 (MOROTTI et al., 2013; MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013). While the present  
164 study confirmed results found earlier, it further revealed promising new information  
165 for using injectable P4 to control the bovine estrus cycle. This strategy may prove  
166 useful for the reproductive management of cattle, because injectable P4 offers  
167 management a way to reduce the cost and handling of cows, especially on farms  
168 with many females of reproductive age. These benefits are due to the greater control  
169 and convenience of a parenteral application, in addition to the hygienic and sanitary  
170 advantages of an injectable solution versus intravaginal devices that can lead to a  
171 higher incidence of reproductive tract disorders.

172 In this study, the cows synchronized with the conventional protocol FTAI  
173 (Control/CIDR) had a higher pregnancy rate (60 %; 27/45) than those synchronized  
174 with P4 injectable/FTAI 36 hours (33.33 %; 15/45;  $P = 0.01$ ; Figure 2). However, the  
175 group receiving injectable P4/FTAI 48 hours had a similar pregnancy rate (48.9 %;  
176 22/45) to those treated with either the conventional protocol ( $P = 0.290$ ) or P4  
177 injectable/FTAI 36 hours ( $P = 0.134$ ). In this context, we highlight that injectable P4  
178 presents another viable alternative source of P4 that could be used successfully in  
179 synchronization protocols for FTAI in cattle.

180 The control of estrous cycle using intravaginal devices has been widely used  
181 to maximize results of FTAI in cattle. Working with ovariectomized Nelore heifers,

182 Maio et al. (2008) showed that the highest peak in plasma progesterone  
183 concentration ( $8.00 \pm 0.58$  ng/mL) was achieved 24 hours after implantation of the  
184 intravaginal device. After this time interval, the concentration underwent a gradual  
185 reduction up to 216 hours, when it achieved the level of zero ng/mL. On the other  
186 hand, also using ovariectomized Nelore heifers, Silveira et al. (2012), observed the  
187 highest peak in plasma progesterone ( $9.31 \pm 8.16$  ng/mL) in 6 hours after insertion of  
188 the intravaginal device. Although these devices remain on the animals for a period of  
189 8 to 9 day, we consider a significant change in the progesterone plasma profile  
190 during this period of time. Considering the lack of information about injectable P4, so  
191 far we do not know its full metabolism period. We recently observed that the  
192 metabolism of injectable P4 seems to have some individual variation, but it is  
193 necessary more investigations about their action and metabolic degradation  
194 (MOROTTI et al., 2013).

195 Morotti et al. (2013) evaluated pregnancy rates in beef cows subjected to a  
196 synchronization protocol with injectable P4. The protocol of 350 mg of P4 and 2 mg  
197 of EB on D0, 500  $\mu$ g of cloprostenol and 300 UI of eCG on D6, 1 mg of EB on D7,  
198 and FTAI after 24 hours was used. Comparing with a conventional protocol with  
199 intravaginal P4 device, those authors found a higher pregnancy rate with the  
200 intravaginal device with 1g of P4 (45.2 %; 10/22) than for the group given 350 mg of  
201 injectable P4 (18.1 %; 4/22;  $P = 0.050$ ). A possible explanation for that may be the  
202 lower diameter of ovulatory follicles in animals that were submitted to injectable P4.  
203 But the number of animals was not too large and the comparison of both sources of  
204 progesterone will be improved when more works clarify the context.

205 We believe that a longer protocol may provide better results with injectable  
206 progesterone. Our comprehension about that comes from the study of Morotti et al.  
207 (2013) in which a short protocol - eight days - resulted in 18% of pregnancy rate,  
208 whereas here we showed rates from 33 to 48 %. The 10 day protocol seems to be  
209 appropriate to provide larger ovulatory follicles and better pregnancy rates.

210 Although these rates are below the rates found in this present study, the  
211 dosage and duration of treatments with injectable P4 are important differences  
212 between the two studies. It is thus possible that the smaller dose of injectable P4  
213 (250 mg per animal) and the longer time for P4 to metabolize (FTAI performed in the  
214 D9 or D10) contributed to an improved pregnancy rate in the present study;  
215 moreover, the present study also included a larger sample size. Indeed, it is worth

216 pointing out that a lower number of animals per group can limit a reliable assessment  
217 of the pregnancy rate

218 Using 25 mg of injectable P4 daily injections combined with 1 mg of EB after 3  
219 days the last application of P4 in Nelore, Ulberg and Lindley (1960) reported a lower  
220 pregnancy rate (38 %; 16/42) than that found in our present study. However, Silveira  
221 et al. (2012) reported a pregnancy rate of 53 % in Nelore cows using an intravaginal  
222 device, which corroborates our results for the Control/CIDR and P4 injectable/FTAI  
223 48 hours groups. The pregnancy rate in our study was also similar to that reported  
224 by Schafer et al. (2007) that in lactating crossbred cows used 0.5 mg melengestrol  
225 acetate (MGA) for 14 days versus CIDR intravaginal device both with 14 days of  
226 treatment. In this study, the MGA and CIDR device were similar (201/327, 61%;  
227 214/323, 66%, respectively). Corroborates with our study Bader et al. (2005), also  
228 showed pregnancy rate of approximately 60% using melengestrol acetate orally for  
229 14 days or 8 days for FTAI.

230

### 231 **Conclusion**

232 Using the P4 injectable to synchronization of Nelore cows, a lower fertility was  
233 observed with insemination performed 36 hours after ovulation induction. However,  
234 those animals inseminated with 48 hours showed pregnancy rates similar to animals  
235 synchronized with an intravaginal device. Therefore, we suggest that the injectable  
236 P4 represents an alternative progesterone source for synchronization in cattle.

237

### 238 **Acknowledgements**

239 We thank Dr. Renato Castanho Francisco for his support in this study, the staff  
240 of farm Santa Edwiges for letting us use their animals and installations, and the  
241 Graduate Program in Animal Science from the State University of Londrina, Londrina,  
242 Parana, Brazil. This research was funded in part by the Farm Santa Edwiges and  
243 Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES)

244

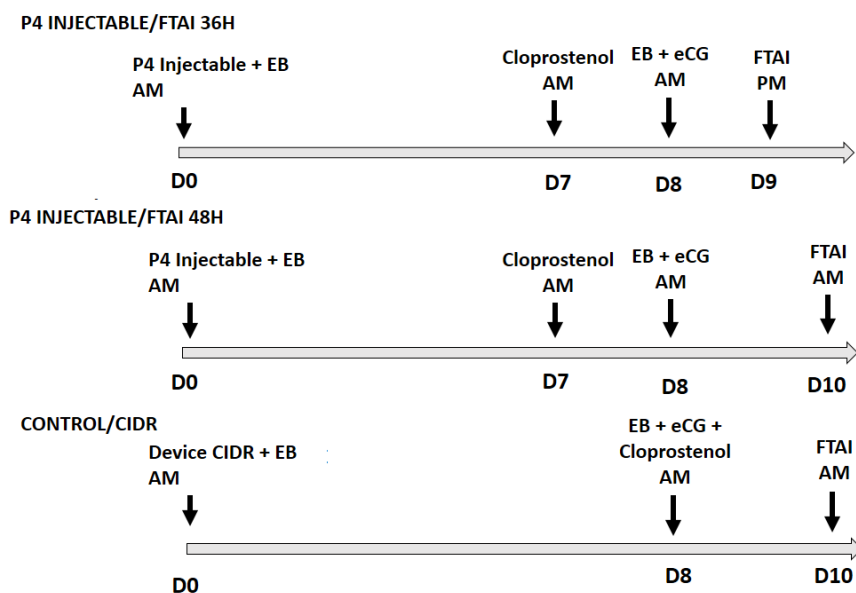
245

246 **References**

- 247 AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.;  
248 LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of  
249 subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Science*, Amsterdam, v.  
250 123, n 2-3, p. 175-179, 2009.
- 251 BADER, J. F.; KOJIMA, F. M.; SCHAFFER, D. J.; STEGNER, J. E.; ELLERSIECK, M.  
252 R.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J. A comparison of progestin-based protocols to  
253 synchronize ovulation and facilitate fixed time artificial insemination in postpartum  
254 beef cows. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 83, n. 1, p. 136-143, 2005.
- 255 BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The  
256 use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef  
257 cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 82-83, p.  
258 479-486, 2004.
- 259 GORDON, I. Controlled breeding in cattle. Part 1: Hormone in the regulation of  
260 reproduction, oestrus, control and set time artificial insemination. *Journal of Animal*  
261 *Breeding and Genetic*, United Kingdom, v. 44, p. 265-275, 1976.
- 262 LAMOND, D. R. Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. *Journal of*  
263 *Animal Breeding and Genetics*, United Kingdom, v. 32, n. 3, p.269-285, 1964.
- 264 MAIO, J. R. G.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; BARUSELLI P. S.; CARVALHO,  
265 M. M.; SENEDA, M. M. Perfil plasmático de progesterona e taxa de prenhez à IATF  
266 de fêmeas bovinas tratadas com Sincrogest® (Dispositivo Intravaginal de  
267 Progesterona) *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, v. 28, n. 165, p.41-44, sept/oct  
268 2008.
- 269 MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination  
270 using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of  
271 Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. *Semina: Ciências*  
272 *Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3873-3882, 2013.
- 273 MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; OLIVEIRA, E. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular  
274 dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial  
275 insemination protocol with injectable progesterone. *Semina: Ciências Agrárias*,  
276 Londrina, v. 34, n. 6, p. 3865-3872, 2013.
- 277 PEGORER, M. F.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; PINHEIRO, V. G.; TRINCA, L.  
278 A.; BARROS, C. M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous  
279 eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI)  
280 protocols for puberal Nelore heifers. *Theriogenology*, New York, v. 75, n. 1, p. 17-  
281 23, 2011.
- 282 QUEZADA-CASASOLA, A.; AVENDAÑO-REYES, L.; MACÍAS-CRUZ U.;  
283 ALEJANDRO RAMÍREZ-GODÍNEZ, J.; CORREA-CALDERÓN, A. Estrus behavior,  
284 ovarian dynamics, and progesterone secretion in Criollo cattle during estrous cycles  
285 with two and three follicular waves. *Tropical Animal Health and Production*,  
286 Edinburgh, v. 46, p.675-684, 2014.

- 287 SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P.  
288 S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows  
289 submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols.  
290 *Theriogenology*, New York, v. 76, n.3, p. 455-63, 2011.
- 291 SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.;  
292 JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P.  
293 S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of  
294 synchronized ovulations in *Bos 10 indicus* cows submitted to a timed artificial  
295 insemination protocol. *Theriogenology*, New York, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.
- 296 SCHAFER, D. J.; BADER, J. F.; MEYER, J. P.; HADEN, J. K.; ELLERSIECK, M. R.;  
297 LUCY, M. C.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J. Comparison of progestin-based  
298 protocols to synchronize estrus and ovulation before fixed-time artificial insemination  
299 in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 85, n. 8, p.  
300 1940-1945, 2007.
- 301 SILVEIRA, E. C.; BORTOLLOTTI, L. A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. Perfil  
302 plasmático de progesterona e taxa de prenhez de bovinos Nelore sincronizados com  
303 novo dispositivo intravaginal de progesterona (Biocowgest®). *Revista Acadêmica de*  
304 *Ciências Agrárias e Ambiental*, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 73-79, 2012.
- 305 ULBERG, L. C.; LINDLEY, C. E. Use of progesterone and estrogen in the control of  
306 reproductive activities in beef cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 19, n.  
307 4, p. 1132-1142, 1960.
- 308 WHEATON, J. E.; LAMB, G. C. Induction of cyclicity in postpartum anestrous beef  
309 cows using progesterone, GnRH and estradiol cypionate (ECP). *Animal*  
310 *Reproduction Science*, Amsterdam, v. 102, n. 3-4, p. 208-216, 2007.
- 311 XU, Z. Z.; BURTON, L. J. Estrus Synchronization of Lactating Dairy Cows with  
312 GnRH, Progesterone, and Prostaglandin F2 $\alpha$ . *Journal of Dairy Science*, Champaign  
313 –Illinois, v. 83, p. 471-476, 2000.

314 **Figure 1.** Schematic representation of the three different synchronization protocols of  
 315 ovulation that were tested Nelore cows (*Bos indicus*) using an injectable P4 solution  
 316 (FTAI 36 or 48 hours after ovulation induction) or an intravaginal P4 device



317

318 **Source:** Elaboration of the authors.

319

320 Note.

321 Group I: P4 injectable/FTAI 36 hours, 45 cows each received an i.m. dose of 250 mg of injectable P4  
 322 and 2 mg of EB on D0. On D7, an i.m. dose of 500 µg of cloprostenol was administered, and 24 hours  
 323 later (D8) 300 IU of eCG and 1 mg of EB was i.m. administered. The FTAI was performed 36 hours  
 324 later (D9).

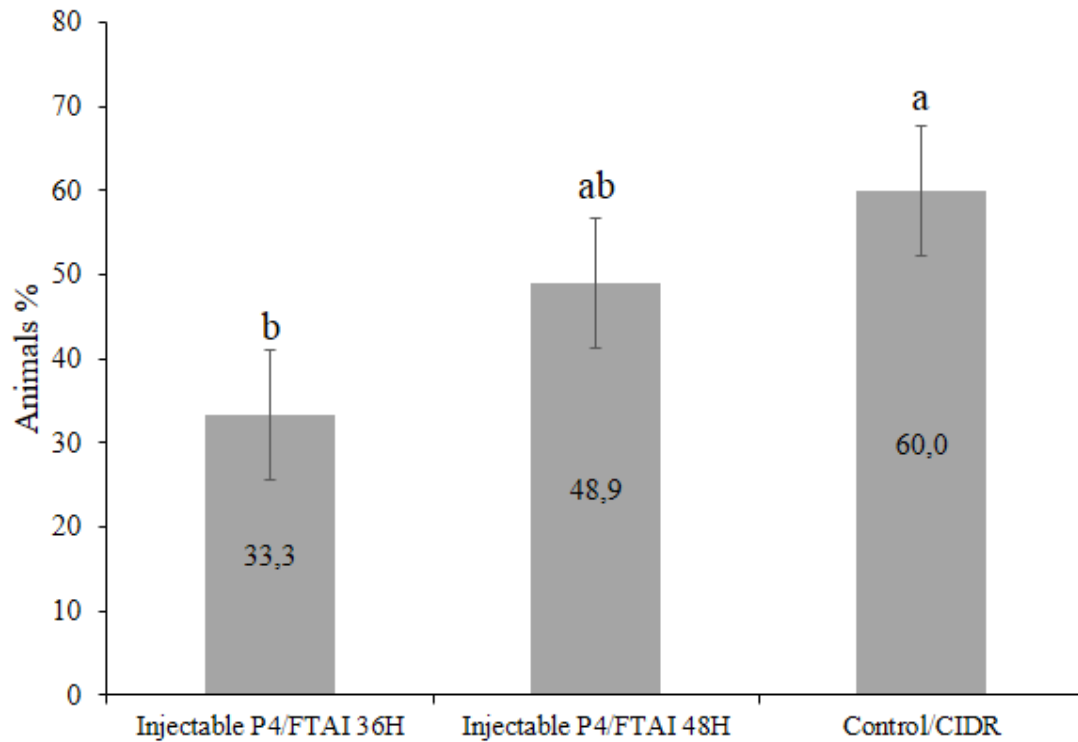
325 Group II: P4 injectable/FTAI 48 hours, 45 cows received the same protocol, except the FTAI was  
 326 done 48 hours after ovulation induction (D10).

327 Group III: Control/CIDR, 45 cows each received an intravaginal device with 1.9 g of P4 and 2 mg of  
 328 EB on D0. On D8, this device was removed, followed by i.m. administration of 500 µg of cloprostenol,  
 329 300 IU of eCG, and 1 mg of EB. The cows were inseminated 48 hours after application of EB.

330 P4: Progesterone (Progressincro, Laboratory Campos Ltda, Londrina, Brazil or CIDR®, Zoetis, São  
 331 Paulo, Brasil). EB: Estradiol benzoate (Syntex®, Syntex, Buenos Aires, Argentina). Cloprostenol  
 332 (Cyclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina). eCG: Equine chorionic gonadotropin (Novormon®,  
 333 Syntex, Buenos Aires, Argentina).

334

335 **Figure 2.** Pregnancy rates in Nelore cows (*Bos indicus*) that were submitted to a  
336 synchronization of ovulation (FTAI) using an injectable P4 solution/FTAI 36 hours, P4  
337 injectable/FTAI 48 hours, or an intravaginal P4 device.



338

339 **Source:** Elaboration of the authors.

340 Note.

341 Different lower-case letters (a, b) indicate statistically different proportions of pregnant cows among  
342 the three treatment groups ( $P < 0.05$ ).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo nós concluímos que vacas Nelore (*Bos indicus*) sincronizadas com progesterona injetável e IATF realizada 48 horas após a indução da ovulação apresentaram taxa de prenhez de 48,9%. Consideramos que esta taxa justifica sua utilização, visto que muitos trabalhos que utilizam os dispositivos intravaginais para sincronização da ovulação apresentam taxas próximas da que encontramos em nossos estudos. A progesterona injetável acarretou menor taxa de prenhez 32,1% sugerindo uma possível indicação de eficiência por categoria reprodutiva.

Com esse trabalho propomos uma nova frente de análise para a progesterona injetável. No momento, talvez não seja possível a imediata substituição dos implantes intravaginais de progesterona por uma apresentação injetável. No entanto, nossas observações sugerem uma perspectiva favorável, em especial ao se considerar i) custo do protocolo, ii) a não necessidade reutilização dos dispositivos intravaginais e iii) maior facilidade operacional e menor stress aos animais. Embora não tenhamos feito uma análise econômica, foi possível estimar que a progesterona injetável é uma forma de torna o protocolo mais barato pelo custo básico deste fármaco Também consideramos a facilidade de implementação do mesmo, pois não temos mais a necessidade dos manejos de inserção e retirada dos dispositivos intravaginais. A questão ambiental parece tornar a progesterona injetável ainda mais promissora. Isto porque o número de animais inseminados em IATF está próximo de seis milhões , o que significa, em termos gerais, seis milhões de dispositivos por ano no meio ambiente. É fato notório que ainda não dispomos de políticas de destinação adequada para estes rejeitos, tampouco do impacto de tais dispositivos quando os mesmos permanecem nas propriedades. Para esse tipo de produto ainda não existe a política da logística reversa que visa o recolhimento dos dispositivos usados, tal como já ocorre com defensivos agrícolas.

Existem ainda outros fatores que justificariam a realização de mais estudos relacionados a progesterona injetável de longa ação em protocolos de IATF, tais como a ausência das vaginites irritativas e a perda de dispositivos, situações ocasionais, mas sempre presentes nos protocolos com a progesterona intravaginal.

Consideramos que as taxas de prenhez obtidas são realmente inferiores aos protocolos que utilizam o dispositivo intra-vaginal. No entanto, pelos aspectos listados acima, temos a convicção de que há um caminho promissor para esta nova alternativa nos protocolos de IATF.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 94, p. 177-188, 1992.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F.; NASSER, L. F.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 22, p. 67-74, 2010.
- BEAL, W. E.; GOOD, G. A.; PETERSON, L. A. Estrus synchronization and pregnancy rates in cyclic and non cyclic beef cow and heifers treated with synchro-mate B or Norgestomet and Alfaprostol. **Theriogenology**, New York, v. 22, p. 59-66, 1984.
- BLACHE, D.; TELLAM, R.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P.V.; MARTIN, G. B. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 165, n. 3, p. 625-637, 2000.
- BÓ, G.; BARUSELLI, P.; MARTINEZ, M. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 307-326, 2003.
- BORGES, A.M.; CARVALHO, B. C.; RUAS, J.R.M. Manejo reprodutivo da vaca mestiça: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Suplemento, Belo Horizonte, n.6, p.157-162, dez. 2009.
- CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 20, p. 368-375, 2008.
- CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ, E.; BENEFIELD, B.C.; VETH, M.J.; SANTOS, N.R. GILBERT, R.O.; BUTLER, W.R.; BAUMAN, D.E. Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4253-4264, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699044>>. Acesso em: 5 maio 2012
- CEPEA. **PIB do Agronegócio** - Dados de 1995 a 2015. USP/CNA. Disponível em: <[http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/other/PIB\\_Cepea\\_1995\\_2015.xlsx](http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/other/PIB_Cepea_1995_2015.xlsx)>. Acesso em: 10 abr. 2015.
- CROWE, M. A. Resumption of Ovarian Cyclicity in Post-partum Beef and Dairy Cows. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 43 (Suppl. 5), p. 20-28, 2008.
- FERNANDES, P. **Inseminação artificial com horário predeterminado em vacas Nelore tratadas com acetato de buserelina, prostaglandina F2 $\alpha$  e benzoato de**

**estradiol**. 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu.

FERNÁNDEZ, D.; SALAZAR, E. **Determinacion de niveles de progesterona en sangre luego de la administracion parenteral de progesterona** y evaluacion de diferentes protocolos de sincronizacion de cellos en vaquillonas de la raza holando. 2007. 58p. Tese (Doutorado em Veterinaria) - Univercidade de La Republica, Facultad de Veterinária, Montevideo.

GINTHER, O.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n.2, p. 383-389, 2000.

GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, New York, v.55, p.1187-94, 1996.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 105, p. 263, 1995.

JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A. et al. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cAMP response to FSH and LH, and follicular atresia. **Biology of Reproduction**, New York, v.51, p.934-44, 1994.

JORRITSMA, R.; CÉSAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRUITWAGEN, C.L.; VOS, P.L.; KRUIP, TA. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 81, n.3-4, p. 225–235, 2004.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 1424-1440, 1996.

KOJIMA, N.; STUMPF, T. T.; CUPP, A. S.; WERTH, L. A.; ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 betaestradiol in circulation of cows. **Biology of Reproduction**, New York, v. 47, p. 1009, 1992.

LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J.M.; WILTBANK, M.C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, New York, v. 84, n. 2, p. 369-78, 2011.

MANN, G. E.; GREEN, M. P.; SINCLAIR, K. D.; DEMMERS, K. J.; FRAY, M. D.; GUTIERREZ, C. G. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 71–79, 2003.

MARTINS, T.; PERES, R.F.; RODRIGUES, A.D.; POHLER, K.G.; PEREIRA, M.H.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L. Effect of progesterone concentrations, follicle

diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, New York, v. 81, n. 3, p. 446-53, 2014.

MAURASSE, C.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Ovarian follicular populations at two stages of an oestrus cycle in heifers given high energy diets. **Journal of animal science**, Champaign, v. 61, n. 5, p. 1194–1200, 1985.

MORALES, J.T.; CAVESTANY, D. Anestro pos parto em vacas lechera: tratamientos hormonales. 2012. **Veterinaria**, Montevideo, v. 48, n. 188, p. 19-27, 2012.

MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; OLIVEIRA, E. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3865-3872, 2013.

MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3873-3882, 2013.

MURPHY, M.G., ENRIGHT, W.J., CROWE, M.A.; McCONNELL, K.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of reproduction and fertility**, United Kingdom, v.92, p.333-338, 1991.

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

PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, p. 85–91, 2014.

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, E.; MAIO, J. R. G.; BINELLI, M. Fertility response in suckled beef cows supplemented with long-acting progesterone after timed artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 27, p. 93-270, 2015.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 301-306, 1997.

RAHE, C. H.; OWENS, R. E.; FLEEGER, J. L.; NEWTON, H. J.; HARMS, P. G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, Baltimore, v. 107, p. 498, 1980.

- RHODES, F.M.; ENTWISTLE, K.W.; KINDER, J.E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. **Biology of Reproduction**, New York, v.55, p.1437-1443, 1996.
- RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SCHOENEMANN, H.M. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.67, p.1520-1526, 1989.
- ROBINSON, J. J. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1-4, p. 25–34, 1996.
- ROCHA, D.C.; BESKOW, A.; PIMENTEL, C.M.M.; MATTOS, R.C.; GREGORY, R.M. Níveis séricos de progesterona em vacas ovariectomizadas tratadas com MAD4® com diferentes... **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 3, p. 974-780, 2011.
- RUBIN, K. C. P. **Particularidades reprodutivas da raça nelore na produção in vitro de embriões (PIVE)**. 2006. 64 f. Monografia (Especialização em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- SANTOS, J.E.P.; NARCISO, C.D.; RIVERA, F.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 2976-2988, 2010.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 98, n. 1, p. 77-84, 1993.
- SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; BULLERMANN B.; WALTERS, D. L. Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 71, n.2, p. 493-501, 1984.
- SCHALLENBERGER, E.; SCHÖNDORFER, A. M.; WALTERS, D. L. Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle. **Acta Endocrinologica**, v. 108, p. 312, 1985.
- SGORLON, S.; STRADAIOLI, G.; GABAI, G.; STEFANON, B. Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.74, n. 1-3, p.123-129, 2008.
- STAGG, K.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.38, n. 1, p.49-61, 1995.
- TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 2985-2991, 1996.

TRENKLE, A.; WILLHAM, R. L. Beef production efficiency. **Science**, New York, v. 198, n. 4321, p. 1009-1015, dec. 1977.

USDA. Department of Agriculture. **Economic Research Service**. 2014. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/>>. Acesso em: 14 fev. 2014.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, New York, v.56, p307–314, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M. **Avaliação da sincronização de ovulação e de fatores relacionados com a produção de leite e taxa de concepção em vacas**. 1998. 116p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, New York, v.77, p.190-201, 2007.

WHITTIER, W. D.; CURRIN, J. F.; SCHRAMM, H.; HOLLAND, S.; KASIMANICKAM, R. K. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch + CIDR or 7-day CO-Synch + CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. **Theriogenology**, New York, v. 80, p. 963–969, 2013.

WILLIAMS, G.L.; TALVERA, F.; PETERSEN, B.J.; KIRSCH, J.D.; TILTON, J.E. Coincident secretion of FSH and LH in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases in systemic progesterone. **Biology of Reproduction**, New York, v.29, p.362-73, 1983.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Post partum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v. 54, p. 25-55, 2000.