



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA F₂ α COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E
BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA**

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

Porto Velho (RO)
2015



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE**

**PROSTAGLANDINA F₂ α COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E
BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA**

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

Orientador: Dr. Luiz F. M. Pfeifer

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Consultar a bibliotecária Daniela Maciel Pinto

C355p

Castro, Natalia Ávila de.

Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em bovinos e bubalinos criados no Bioma Amazônia / Natalia Ávila de Castro, 2015.

62 f.

Orientador: Luiz Francisco M. Pfeifer

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)- Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

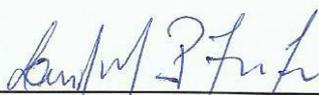
1. Fertilidade animal. 2. Inseminação artificial - Ovulação. 3. Bovinocultura Leiteira. 4. Bubalinocultura. 5. Prostaglandina F2 α . I. Fundação Universidade Federal de Rondônia.

CDD (21.ed.) 636.0824

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO

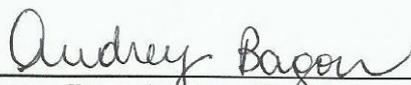
“PROSTAGLANDINA F2a COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO EM BOVINOS E BUBALINOS CRIADOS NO BIOMA AMAZÔNIA”.

Comissão Examinadora



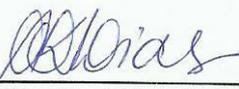
Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dra. Audrey Bagon
Membro

Faculdades Integradas Aparício Carvalho



Dra. Ana Karina Dias Salman
Membro

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dra. Michelliny de Matos Bentes Gama
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Porto Velho, 7 de Janeiro de 2015.

Resultado: _____

Aprovada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por toda a sua bondade e misericórdia; por me conceder a oportunidade desta existência, com saúde; por todo mal tirado do meu caminho e pela belíssima oportunidade a mim concedida de realizar este mestrado em um local tão oportuno e junto de pessoas tão importantes para a minha caminhada;

Ao meu pai Jairo Silva de Castro, por todo o amor e atenção, por não me deixar faltar nada e por acreditar sempre em mim; e a Sandra, por todo amor e companheirismo ao meu pai, e por ter nos adotado, apesar das dificuldades, com toda generosidade e também muito amor;

Ao meu orientador Luiz F. M. Pfeifer, pela orientação durante todas as etapas do mestrado, pela confiança em mim depositada, por todos os valiosos conselhos, que certamente contribuíram para a minha formação profissional; e também por todo carinho com que me recebeu, pela atenção e preocupação. Por se revelar um verdadeiro amigo, a quem devo muito e poderá sempre contar comigo;

À minha avó Maria, por toda dedicação para comigo e meu irmão em todos os momentos de maior dificuldade para a família; e ao meu avô Giasone pela alegria de todos os dias, pela leveza com que encara cada dia;

À minha tia Jonci, por todo suporte, pela força e exemplo de mulher, em quem busco me espelhar e ao meu tio Jaldo, pela pureza de coração e por todo carinho dedicado a todos.

Ao meu irmão Rodrigo e ao meu primo Rômulo, por fazerem parte essencial da minha caminhada; e ao meu primo Júlio e ao meu amado afilhado Arthur;

A amiga Audrey Bagon, por toda amizade, carinho, ajuda nos experimentos e principalmente por todo o apoio durante estes dois anos;

À Embrapa – Rondônia, por ceder as instalações para que os experimentos fossem realizados;

Aos amigos encontrados na Embrapa – Rondônia, por todo o auxílio durante esta estadia em Porto Velho, pela receptividade; especialmente a Juliana Dias e a Ana Karina Salman, pela amizade e ao pesquisador Eduardo Schmitt, pelo auxílio durante os experimentos, disposto a ajudar, mesmo em dias e horários de seu descanso;

Aos estagiários Gabriela, Vitor, Karol, Paulo Marcos (PM), pelo o auxílio e dedicação no cumprimento das atividades; e também aos funcionários do campo experimental da Embrapa, Ricardo, Marcelo, Ribamar e seu Adalto, por colaborarem na execução dos experimentos;

A todos, e àqueles que não mencionei, mas de alguma forma me ajudaram durante esse período, a minha sincera gratidão!

RESUMO

A Prostaglandina F2 α (PGF), amplamente utilizada em protocolos de sincronização de cio por sua ação luteolítica, tem demonstrado também induzir a ovulação de fêmeas bovinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de um análogo da PGF (d-Cloprostenol) como indutor de ovulação em diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo-fixado para bovinos e bubalinos. Para a elaboração da dissertação de mestrado, foram realizados cinco experimentos que estão descritos em dois artigos científicos, os quais serão submetidos para publicação. O objetivo do Artigo 1 foi avaliar a eficiência de um análogo de PGF como indutor de ovulação em búfalas e vacas leiteiras. A hipótese testada foi de que a Prostaglandina induz a ovulação tanto em fêmeas bovinas, como em bubalinas. Dessa forma, três experimentos foram conduzidos, sendo um com búfalas e dois com vacas, ambas em lactação. As fêmeas foram submetidas a protocolos de sincronização de ovulação baseados no uso de estradiol e progesterona para induzir a nova onda folicular e prostaglandina (PGF), como agente luteolítico no momento da retirada do implante de progesterona. No dia da indução da ovulação, as fêmeas receberam d-Cloprostenol (Grupo PGF) ou Solução salina (0,9% de NaCl; Grupo CTL). Avaliações ultrassonográficas foram realizadas para detectar o momento da ovulação de cada fêmea. Com base nos resultados obtidos, constatou-se que nossa hipótese foi parcialmente comprovada, uma vez que a PGF antecipou a ovulação em vacas lactantes, entretanto, os efeitos não foram conclusivos em búfalas lactantes. O Artigo 2 teve como objetivos: 1) avaliar se a Prostaglandina F2 α (PGF) pode substituir o cipionato de estradiol (ECP) usado para induzir a ovulação em um protocolo hormonal a base de GnRH e progesterona e 2) determinar se a antecipação da dose luteolítica da PGF seria capaz de potencializar a sua ação ovulatória em um protocolo livre de estradiol. A hipótese foi de que a PGF induz a ovulação de vacas e novilhas submetidas a protocolos livres de estradiol. Dois experimentos foram conduzidos com vacas e novilhas mestiças (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). As avaliações ultrassonográficas foram feitas da mesma forma que nos Experimentos do Artigo 1. No Experimento 1, as fêmeas foram tratadas com PGF (Grupo PG), ECP (Grupo ECP) ou NaCl (Grupo CTL) no momento da indução da ovulação. Os resultados obtidos neste Experimento sugerem que, apesar dos indutores hormonais PGF e ECP não diferirem do grupo Controle, o uso de PGF em vacas lactantes tendeu a aumentar a sincronia das ovulações em relação aos animais que não foram induzidos a ovular. No Experimento 2, todas as vacas receberam a dose luteolítica da PGF 24 horas antes da remoção do implante de progesterona e no dia dos tratamentos para induzir a ovulação, um grupo recebeu d-Cloprostenol (Grupo PG) e o outro recebeu NaCl (Grupo CTL). Os resultados demonstraram que a PGF aumentou a taxa de ovulação em comparação com o Grupo que não recebeu estímulo ovulatório, além disso, houve uma tendência de maior sincronia das ovulações no Grupo que recebeu PGF. Com base nos resultados obtidos, concluímos que Prostaglandina F2 α antecipa a ovulação em vacas lactantes, além disso, ela pode ser utilizada em protocolos livres de estradiol. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para avaliar o seu uso em fêmeas bubalinas.

Palavras-chave: Fertilidade, PGF, Vacas leiteiras.

ABSTRACT

Prostaglandin F_{2α} (PGF), widely used in estrous synchronization protocols for its luteolytic function. Moreover, PGF has demonstrated to induce ovulation in bovine females. The aim of this study was to evaluate the use of PGF-analogue (d-Cloprostenol) as ovulatory stimulus in different timed artificial insemination (TAI) protocols in cattle and buffaloes. In this Master of Science thesis, five experiments were performed, which are described in two manuscripts, which will be submitted to publication. The aim of the Study 1 was to evaluate the efficiency of a PGF analogue as ovulatory stimulus in buffaloes and dairy cows. The hypothesis tested was that the Prostaglandin induces ovulation in both cows and buffaloes. Thus, three experiments were performed, one with lactating buffaloes and two with lactating cows. Females were subjected to ovulation synchronization protocols based on the use of estradiol and progesterone to induce new follicular wave and prostaglandin (PGF) as luteolytic agent in the time of withdrawal of progesterone device. On Day 9, the females were given d-Cloprostenol (PGF Group) or saline (0.9% NaCl; CTL Group). Ultrasounds exams were performed to detect the time of ovulation. Based on the results, it was found that our hypothesis was partially confirmed, since the PGF anticipated ovulation in lactating cows, however, the effects were not conclusive in lactating buffaloes. The aims of the Study 2 were: 1) to evaluate if Prostaglandin F_{2α} (PGF) can replace estradiol cypionate (ECP) used as ovulatory stimulus in a GnRH-progesterone based protocol, and; 2) to determine whether the anticipation of luteolytic dose of PGF would be able to improve its ovulatory action in a free estradiol protocol. The hypothesis was that the PGF induces ovulation of cows and heifers to free estradiol protocols. Two experiments were conducted with cows and crossbred Girolando heifers (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). Ultrasound evaluations were performed similarly as in Experiments of Study 1. In Experiment 1, the females were treated with PGF (PG Group), ECP (ECP Group) or NaCl (CTL Group) 1 d after CIDR removal. Results suggest that, although the ovulatory stimuli, PGF and ECP, did not differ from the Control Group, the use of PGF tended to increase the synchronization of ovulation in comparison to females which were not induced to ovulate. In Experiment 2, all cows received a luteolytic dose of PGF, 24 h before progesterone device removal. The ovulatory treatments, d-Cloprostenol (PG group) and NaCl (CTL Group) were given 1 d after CIDR removal. The results demonstrated that PGF increased ovulation rate compared with the CTL group. In addition, there was a trend toward greater synchronization of ovulation for PGF Group. Based on these results, we conclude that Prostaglandin F_{2α} hasten ovulation in dairy cattle, moreover, it can be used in free estradiol protocols. However, more studies should be performed to evaluate its use in buffalo females.

Keywords: Fertility, PGF, Dairy cows.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE = Benzoato de estradiol

CC = Condição corporal

CL = Corpo lúteo

DPP = Dias pós-parto

eCG = Gonadotrofina coriônica equina

ECP = Cipionato de estradiol

FD = Folículo dominante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas

IATF = Inseminação artificial em tempo-fixo

LH = Hormônio luteinizante

P4 = Progesterona

PGF = Prostaglandina F_{2α}

VE = Valerato de estradiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho ilustrativo dos protocolos hormonais de sincronização de cio e IATF *Ovsynch*, *Co-Synch* e *Heatsynch* utilizados em bovinos. 20

ARTIGO 1.

Figura 1. Desenhos experimentais utilizados nas (A) búfalas do Experimento 1 (n=16), (B) vacas do Experimento 2 (n=16) e (C) vacas do Experimento 3 (n = 16). 30

Figura 2. Distribuição e porcentagem de (A) búfalas do Experimento 1 e vacas do (B) Experimento 2 e (C) do Experimento 3 que ovularam após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona nos Grupos PGF e CTL..... 35

ARTIGO 2.

Figura 1. Desenho experimental utilizado nas (A) novilhas e vacas leiteiras do Experimento 1 e (B) vacas leiteiras do Experimento 2. 44

Figura 2. Porcentagem e distribuição do momento da ovulação de fêmeas *Bos taurus* vs. *Bos indicus* leiteiras tratadas com (A) 2 mL de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) e 600µg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de cipionato no Experimento 2 e (B) 2 ml de NaCL 0,9% (Grupo CTL, n = 7) ou 500 µg de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 8)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicação do período de carência informado na bula de produtos comerciais feitos à base de análogos de 17- β Estradiol.22

ARTIGO 1.

Tabela 1. Percentagem de búfalas (Experimento 1) e vacas (Experimento 2 e Experimento 3) que ovularam durante os tratamentos, taxa de ovulação sincronizada, média (\pm Erro Padrão) do momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e do diâmetro do folículo ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF (Grupo PGF) ou nenhum tratamento (Grupo CTL) 24 horas após a remoção do implante intravaginal de progesterona..... 32

ARTIGO 2.

Tabela 1. Momento da ovulação, taxas de ovulação e de ovulação sincronizada e diâmetro do folículo ovulatório em vacas e novilhas leiteiras tratadas com 2 ml de NaCl a 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) e 0,6 mg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de Cipionato de estradiol (Grupo ECP, n = 23) 45

Tabela 2. Porcentagem de vacas que ovularam durante o tratamento, percentagem de ovulações sincronizadas, momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e diâmetro do folículo ovulatório em vacas que receberam tratamento com PGF (Grupo PG, n = 8) ou 2 ml de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 7). 46

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. GERAL	14
2.2. ESPECÍFICOS	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1. CONTROLE EXÓGENO DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS E BUBALINOS .	14
3.1.1. Breve histórico.....	14
3.1.2. Vantagens	15
3.1.3. Limitações	16
3.2. INDUTORES DE OVULAÇÃO	16
3.3. ASSOCIAÇÃO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL E PROGESTERONA	18
3.4. PROTOCOLOS A BASE DE GNRH	19
3.5. LIMITAÇÕES DO USO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL EM PRODUÇÃO ANIMAL	21
3.6. A DUPLA FUNÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS	23
4. ARTIGO 1.....	25
Resumo	25
Abstract.....	26
Introdução	26
Material e Métodos	28
<i>Experimento 1</i>	28
<i>Experimento 2</i>	28
<i>Experimento 3</i>	29
<i>Avaliações Ultrassonográficas e Definições</i>	29

<i>Análises estatísticas</i>	30
Resultados	31
<i>Experimento 1</i>	31
<i>Experimento 2</i>	31
<i>Experimento 3</i>	31
Discussão	32
Referências.....	36
5. ARTIGO 2.....	40
<i>Resumo</i>	40
<i>Abstract</i>	41
Introdução	41
Material e Métodos	43
<i>Experimento 1</i>	43
<i>Experimento 2</i>	43
<i>Avaliações Ultrassonográficas e Definições</i>	44
<i>Análises estatísticas</i>	44
Resultados	45
<i>Experimento 1</i>	45
<i>Experimento 2</i>	46
Discussão	47
Referências.....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. REFERÊNCIAS GERAIS	55

1

2 1. INTRODUÇÃO

3 O agronegócio é responsável por 22,74% do PIB no Brasil (Centro de Estudos
4 Avançados em Economia Aplicada, 2011). Neste âmbito, a atividade pecuária contribui com
5 uma fatia considerável deste segmento, com aproximadamente 211 milhões cabeças de gado
6 (FAOSTAT, 2012). Deste efetivo, cerca de 17% é destinado a produção de leite, a qual foi de
7 32,304 bilhões de litros de leite em 2012, colocando o Brasil no sexto lugar mundial em
8 produção do leite (FAOSTAT, 2012). O valor bruto da produção dos dois segmentos da
9 pecuária é estimado em R\$ 67 bilhões, sendo esse valor, aliado a presença da atividade em
10 todos os estados brasileiros, evidências da importância econômica e social da bovinocultura
11 em nosso país.

12 A região norte do Brasil, embora não seja considerada grande produtora de leite no
13 país, produziu 1,7 bilhões de litros de leite em 2012, sendo o estado de Rondônia, o maior
14 produtor da região, responsável por 42% da produção (IBGE, 2012). A produção leiteira de
15 Rondônia não representa tanta importância nacional se comparada às regiões sul e sudeste,
16 entretanto essa produção vêm crescendo nos últimos anos, como resultado de um aumento
17 quantitativo e qualitativo dos rebanhos. Em relação a produção de bubalinos, na última
18 década, o rebanho mundial, atualmente estimado em 195 milhões de cabeças, aumentou cerca
19 de 15%, com um aumento na produção de leite de aproximadamente 35% (FAOSTAT, 2011).
20 No Brasil, o rebanho é composto por aproximadamente 1,15 milhão de bubalinos, sendo a
21 maior produção encontrada na região norte, responsável por cerca de 70% da produção total
22 de búfalos do país (MAPA, 2011). Embora o rebanho bubalino brasileiro seja
23 consideravelmente menor em comparação com o bovino, essa produção representa uma
24 importante fonte de renda em determinadas regiões, especialmente o norte, em que a
25 proporção de bubalinos é consideravelmente maior do que no resto do país.

26 O aumento produtivo dos rebanhos é uma crescente preocupação, especialmente neste
27 momento, em que a busca por práticas sustentáveis têm incentivado pesquisadores a
28 desenvolver tecnologias que permitam produzir cada vez mais em menores extensões de terra,
29 com menos insumos. Neste sentido, o manejo reprodutivo, sendo um importante fator
30 associado com a rentabilidade da pecuária bovina e que afeta diretamente a produtividade de
31 um rebanho, deve ser eficiente para que a propriedade leiteira seja sustentável. Neste âmbito,
32 quanto mais tecnificado for o sistema de produção, principalmente quando biotécnicas da
33 reprodução como inseminação artificial (IA) e controle farmacológico do ciclo estral, maior

34 será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva. Apesar da disponibilidade dessas
35 biotecnologias, a eficiência reprodutiva e consequentemente a rentabilidade dos sistemas de
36 produção tanto de bovinos de corte quanto de leite, no Brasil, ainda é considerada baixa
37 quando comparado a países desenvolvidos. Uma das formas de tornar o Brasil um país mais
38 competitivo na produção produtos de origem animal é através do aumento dos índices
39 reprodutivos e do mérito genético do rebanho. Para tanto, ferramentas reprodutivas como a
40 inseminação artificial em associação com o controle farmacológico do ciclo estral permitem
41 que fêmeas sejam inseminadas em momentos mais adequados, facilitando assim, o manejo e a
42 disseminação da IA e o aumento do mérito genético dos animais comercializados.

43 Neste sentido, existe uma grande variedade de protocolos de sincronização de
44 ovulação comprovadamente eficientes para bovinos e quem vem sendo testados e aplicados
45 também em bubalinos (BARUSELLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; CAMELO, 2002;
46 BARUSELLI & CARVALHO, 2005; ROLIM FILHO et al., 2009) com algumas alterações
47 para que sejam respeitadas as particularidades de cada espécie. Grande parte dos protocolos,
48 especialmente os aplicados no Brasil, utilizam ésteres de estradiol, por apresentar boa
49 eficiência e baixo custo. Entretanto diversos países proibiram o uso deste hormônio em
50 produção animal devido ao seu poder residual, sendo relacionado com o desenvolvimento de
51 tumores em humanos que ingerem alimentos contendo estes resíduos.

52 Muitos dos países que proíbem o uso de estradiol são importantes importadores dos
53 produtos brasileiros, dessa forma, é necessário estudar alternativas que possam substituir o
54 uso de ésteres de estradiol, sem que a fertilidade dos animais seja prejudicada, e garantindo a
55 seguridade para humanos que ingerem produtos de origem animal. Além disso, a retirada do
56 estradiol dos protocolos evitaria que os nossos produtos sofram embargos dos mercados mais
57 exigentes. Neste sentido, sabe-se que os análogos de Prostaglandina F_{2α} (PGF), amplamente
58 utilizados em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF) por seu efeito
59 luteolítico, possui ação direta sobre a ovulação (SILVA & REEVES, 1985; ALGIRE et al.,
60 1992; BRIDGES & FORTUNE, 2007). Além disso, estudos já demonstraram que a aplicação
61 exógena de d-Cloprostenol (análogo de PGF) induz a primeira ovulação em novilhas de corte
62 (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012), sendo mais recentemente demonstrado que
63 a PGF antecipa a ovulação em novilhas púberes submetidas a sincronização de ovulação e em
64 vacas lactantes, produzindo resultados semelhantes aos alcançados com o uso de ésteres de
65 estradiol, sem prejudicar a fertilidade (PFEIFER et al., 2014). Apesar da PGF ser uma
66 alternativa para substituir os ésteres de estradiol como indutor de ovulação, ainda não há

67 estudos que demonstrem o efeito da PGF em protocolos livres de estradiol. Além disso, em
68 bubalinos não existem estudos que comprovem a eficácia da PGF sobre a ovulação.

69 Baseado nessas considerações, os estudos que fazem parte da dissertação de mestrado
70 foram realizados para avaliar a eficiência da PGF como indutor de ovulação em protocolos de
71 sincronização de cio e IATF. Para tanto, foram desenvolvidos, durante o período de fevereiro
72 de 2013 a abril de 2014, cinco experimentos baseados na adaptação de protocolos utilizados
73 em fêmeas bovinas e bubalinas. Os experimentos estão dispostos em dois artigos científicos,
74 que serão submetidos para publicação.

75

76 2. OBJETIVOS

77 2.1. GERAL

78 Determinar o efeito de um análogo de Prostaglandina F_{2α} (d-Cloprostenol) como
79 indutor de ovulação em protocolo utilizados em fêmeas leiteiras bovinas e bubalinas.

80 2.2. ESPECÍFICOS

- 81 - determinar o efeito da PGF como indutor de ovulação em búfalas leiteiras;
- 82 - avaliar o perfil ovulatório de vacas e novilhas leiteiras tratadas com um análogo de PGF em
83 comparação com o ECP usado no protocolo *Heatsynch*;
- 84 - avaliar se a antecipação da luteólise melhora a sincronização da ovulação em protocolos
85 livres de estradiol que usam a PGF como indutor de ovulação.

86

87 3. REFERENCIAL TEÓRICO

88 3.1. CONTROLE EXÓGENO DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS E 89 BUBALINOS

90 3.1.1. Breve histórico

91 Os primeiros estudos acerca do controle do ciclo estral foram realizados no início da
92 década de 40, em que observou-se que repetidas injeções de progesterona por 14 dias
93 apresentavam alta taxa de expressão de cio, entretanto, a fertilidade não era potencializada
94 (JOCHLE, 1993). Nos anos 50, vários progestágenos, administrados por via oral, passaram a
95 substituir as repetidas injeções de progesterona (ZIMBELMAN & SMITH, 1966). Apesar da
96 alteração na via de administração, ainda eram necessárias administrações diárias e a baixa
97 fertilidade persistia. Os problemas de fertilidade subsequente aos tratamentos com

98 progesterona, aparentemente ocorriam devido ao desenvolvimento de folículos persistentes e
99 da reduzida competência ovocitária (ANDERSON & DAY, 1994; MIHM et al., 1994).

100 No início dos anos 70 surgiram os primeiros dispositivos auriculares liberadores de
101 progesterona (Norgestomet) (WILTBANK et al., 1971), evitando a necessidade de sua
102 administração diária. Entretanto, somente com a descoberta da prostaglandina como fator
103 uterino luteolítico (DOUGLAS & GINTHER, 1973; MCCRACKEN et al., 1972), é que
104 houve considerável aumento nas taxas de concepção, quando uma injeção de prostaglandina
105 foi associada aos protocolos com progestágeno. Com a melhora na habilidade do controle do
106 desenvolvimento folicular ovariano, a duração dos tratamentos progestágenos nos protocolos
107 de sincronização tem sido progressivamente reduzida. Estudos realizados na década de 90,
108 demonstraram que a administração de estradiol em associação com os progestágenos
109 sincronizaram o desenvolvimento folicular, o que permitiu que o tempo dos tratamentos de
110 progestágenos fossem reduzidos (~1 semana) e que fertilidade aceitável para IATF fosse
111 alcançada (BO et al., 1995).

112

113 3.1.2. Vantagens

114 Uma importante vantagem do controle exógeno do ciclo estral é o fato de permitir que
115 as fêmeas sejam inseminadas em momento pré-determinado, excluindo-se, assim, a
116 necessidade de detecção de cio, que é uma das principais limitações da inseminação artificial
117 convencional, pois grande parte dos cios não são visualizados. Essa falha ocorre pelo fato de
118 muitas vacas manifestarem cio no período da noite, e outras apresentarem cio silencioso.
119 Dessa forma, sabe-se que cerca de 30% dos animais não são detectados em cio, representando
120 uma queda na percentagem de fêmeas inseminadas. De acordo com Baruselli et al. (2004a),
121 em *Bos indicus*, as taxas de detecção de estro são ainda menores do que em *Bos taurus*, por
122 apresentarem uma maior expressão de cios noturnos e por serem de curta duração. Em
123 bubalinos, a inseminação só é viabilizada com a previa sincronização das ovulações, visto que
124 o subestro ou estro silencioso é o principal fator associado a baixa eficiência reprodutiva nesta
125 espécie (KANAI & SHIMIZU, 1983; PRAKASH 2002; MADAN & PRAKASH 2007),
126 especialmente durante os períodos quentes, ou em regiões em que é quente o ano todo, como
127 norte brasileiro.

128 Além disso, a sincronização de ovulação para IATF possibilita que uma parcela
129 significativa do rebanho se torne gestante logo após o período voluntário de espera, reduzindo
130 o período de serviço e o intervalo entre partos, pois as fêmeas podem ser induzidas ao cio a

131 partir do 40° dia pós-parto (DPP). Dentre as vantagens de inseminar as vacas em tempo-fixado
132 inclui-se, ainda, o fato de encurtar a estação de monta da propriedade, além de produzir
133 bezerros mais uniformes, permitindo que se programe o nascimento dos animais para um
134 período de melhores condições climáticas e de pastagem, por exemplo.

135 Dessa forma, várias associações hormonais utilizadas para controlar o ciclo estral vêm
136 sendo estudadas e utilizadas na tentativa de maximizar o potencial reprodutivo e produtivo
137 dos rebanhos; sendo que o sucesso desses protocolos, assim como o seu impacto econômico
138 já foram bem descritos (BARUSELLI et al., 2004b; BO et al., 1994, 1995, 2003).

139

140 3.1.3. Limitações

141 Apesar das vantagens da sincronização de ovulação e IATF, existem algumas
142 limitações, tais como a necessidade de haver um técnico especializado para estabelecer o
143 melhor protocolo para cada categoria animal. Além disso, deve-se selecionar os animais que
144 poderão entrar no programa, de acordo com a condição corporal de cada vaca e as condições
145 reprodutivas de vacas e novilhas. Este fator requer muita atenção, pois sabe-se que o estado
146 corporal do animal está diretamente relacionado à fertilidade (GOTTSCHELL, 2002). De
147 acordo com Humblot et al. (1996), os animais devem apresentar um escore de condição
148 corporal mínimo de 2,5 para que se atinja resultados satisfatórios na prenhez.

149 Para isso, o ideal é que se faça uma avaliação das condições gerais de cada candidata à
150 entrar no programa de sincronização de ovulação e IATF, e uma avaliação das condições
151 uterinas e ovarianas, através de exame ultrassonográfico, no intuito de detectar se a fêmea está
152 em atividade estral, bem como detectar possíveis infecções uterinas, cistos ovarianos ou
153 outras alterações (DESCÔTEAUX et al., 2010) que impossibilitem o sucesso da técnica.

154

155 3.2. INDUTORES DE OVULAÇÃO

156 Nos protocolos de sincronização de ovulação atualmente utilizados, são feitas
157 associações hormonais entre uma fonte de progesterona associada a um indutor de ovulação
158 no início do protocolo para induzir uma nova onda folicular, uma dose luteolítica de
159 Prostaglandina e um indutor de ovulação no final do protocolo, no intuito de permitir que as
160 ovulações ocorram no menor intervalo de tempo possível. Um indutor de ovulação ideal é
161 aquele que induz, dentro de um intervalo máximo de 24 horas, todas as ovulações, para que
162 ocorram no momento mais aproximado ao momento da inseminação. Da mesma forma, deve-

163 se programar as inseminações, de acordo com o indutor utilizado, já que o mecanismo de ação
164 varia de acordo com o hormônio aplicado. Neste sentido, os indutores de ovulação atualmente
165 utilizados no Brasil para sincronização de ovulação e IATF são os análogos de GnRH (ex.
166 buserelina, lecirelina) e o estradiol 17β e os ésteres de estradiol (Benzoato, Valerato e
167 Cipionato de estradiol).

168 O GnRH é o principal indutor de ovulação utilizado nos protocolos aplicados nos
169 EUA, Canadá e nos países da Europa, onde o uso de estrógenos é proibido. Este hormônio
170 age diretamente na hipófise, estimulando a liberação de LH. Dessa forma, a ovulação
171 induzida pelo GnRH ocorre mais rapidamente do que ocorre com o estradiol e seus ésteres.
172 De acordo com Pursley et al. (1995), em um protocolo baseado no uso de GnRH-PGF-GnRH,
173 a ovulação ocorre cerca de 24 a 32 horas após aplicação exógena da segunda dose do GnRH.
174 Em búfalas, se preconiza somente o uso de GnRH para induzir a ovulação, pois esta espécie
175 parece não responder ao estradiol exógeno

176 Os ésteres de estradiol são os indutores de ovulação mais utilizados nos rebanhos
177 brasileiros, devido ao seu baixo custo em relação ao GnRH. O mecanismo de ação ocorre a
178 nível hipotalâmico, estimulando a maior liberação de GnRH e, assim, estimular a secreção
179 hipofisária de LH; portanto, a ovulação ocorre mais tarde do que ocorre na administração de
180 GnRH. Os estrógenos se diferem, principalmente, pelo tempo de meia-vida de cada um, sendo
181 o benzoato de estradiol (BE) o éster com meia-vida mais curta (~ 3 dias), o valerato de
182 estradiol (VE) e o cipionato de estradiol (ECP) apresentam meia-vida intermediária (~ 7-8
183 dias) e longa (~ 10-12 dias), respectivamente. O valerato de estradiol não é
184 convencionalmente utilizado de forma isolada, para induzir a ovulação; somente em produtos
185 comerciais que associam este estrógeno com um progestágeno, como no caso no implante
186 auricular Crestar[®] (Norgestomet + VE). A ovulação induzida pelo BE administrado 24 após a
187 remoção da fonte de progesterona ocorre cerca de 69 h após a indução (MARQUES et al.,
188 2003; PFEIFER et al., 2014). Já quando se utiliza o ECP, a ovulação ocorre cerca de 55h após
189 a aplicação do estrógeno (PANCARCI et al., 2002).

190 De acordo com Stevenson et al. (2004), com o uso do GnRH para induzir a ovulação,
191 a taxa de cio é baixa, pois o pico de estrogênio secretado pelo folículo pré-ovulatório é
192 prematuramente suprimido pelo pico de LH. Em um estudo foi relatado que a taxa de cio foi
193 de 20% após a injeção de GnRH para induzir a ovulação (STENVENSON et al., 1996). Dessa
194 forma, o uso de GnRH é um fator limitante em protocolos que utilizam observação de cio para
195 inseminação. Por outro lado, O GnRH é mais efetivo em causar o pico pré-ovulatório de LH
196 e, conseqüentemente, a ovulação do que o estradiol (STEVENSON et al., 2004).

197 Os ésteres de estradiol, induzem fortemente as manifestações de cio. Essa
198 característica, considerada uma vantagem para alguns, é observada principalmente quando se
199 utiliza o ECP como estímulo ovulatório; entretanto, muitas vezes, o cio observado não se
200 seguiu de ovulação, sendo caracterizado como “falso cio”, o que se torna uma desvantagem,
201 pois induz ao desperdício de sêmen. Além disso, devido ao seu poder residual em produtos
202 cárneos e lácteos, o uso de estradiol e seus ésteres em produção animal é proibido em alguns
203 países (COMUNIDADE EUROPEIA, 2008).

204

205 3.3. ASSOCIAÇÃO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL E PROGESTERONA

206 Grande parte dos protocolos incluem a associação de uma fonte de progesterona ao
207 benzoato de estradiol (BE) para sincronizar as ovulações tanto em vacas de corte quanto em
208 vacas de leite (MACMILLAN & PETERSON, 1993, MACMILLAN et al., 1996; BURKE et
209 al., 1996; BÓ et al., 2002). No início do tratamento (Dia 0 do protocolo) esta associação é
210 feita para induzir a emergência de uma nova onda folicular. Após a retirada da fonte de
211 progesterona (Dia 8 ou 9), é administrado um análogo de prostaglandina para induzir a
212 regressão do corpo lúteo (CL) e por fim se utiliza o ECP ou BE para induzir a ovulação. A
213 preferência pelos ésteres ocorre devido à redução no custo do protocolo quando comparado ao
214 GnRH, sem que haja redução nos índices reprodutivos. Além disso, o estradiol administrado
215 em associação com a progesterona exógena no início do protocolo resulta em melhor
216 sincronia na emergência folicular. Dessa forma, os programas de sincronização de estro
217 utilizados no Brasil normalmente utilizam os ésteres de estradiol no início e no final do
218 protocolo, por seus benefícios e por não haver restrições quanto ao uso do estradiol para fins
219 de reprodução animal.

220 De acordo com Bridges et al. (1999), os ésteres de estradiol aplicados no início do
221 tratamento com progestágenos promovem boa taxa de sincronização de estro. O tratamento
222 com estradiol-17 β associado aos progestágenos, atualmente utilizados principalmente na
223 forma de dispositivos intravaginais, é capaz de provocar regressão folicular, resultando na
224 emergência de uma nova onda folicular, em média, 4,3 dias após o tratamento (BO et al.,
225 1994). Além disso, o estradiol empregado no final do tratamento, para sincronizar a ovulação,
226 promove um *feedback* positivo sobre as concentrações de LH logo após a remoção da fonte de
227 progesterona exógena, o que induz o pico pré-ovulatório de LH.

228 Para induzir a ovulação, recomenda-se que o BE seja administrado 24 horas após a
229 remoção do implante liberador de progestágeno (BÓ et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002,

230 2005; BARUSELLI et al., 2004c). Entretanto, outros estudos demonstraram a possibilidade
231 de aplicar o ECP no momento da retirada do implante de progestágeno, no intuito de reduzir o
232 manejo, resultando em taxas de prenhez semelhantes ao uso do BE (MARQUES et al., 2004;
233 PENTEADO et al., 2005; AYRES et al., 2006).

234 De acordo com Moraes et al. (2002), o estrógeno pode estimular ou inibir a liberação
235 de gonadotrofinas, dependendo da dose e das concentrações sanguíneas de progesterona. Em
236 doses fisiológicas e baixas concentrações de progesterona, o estrógeno estimula a liberação de
237 LH para que ocorra a ovulação. Ao contrário, elevadas doses de estradiol, na presença de
238 elevadas concentrações de progesterona, bloqueiam as gonadotrofinas.

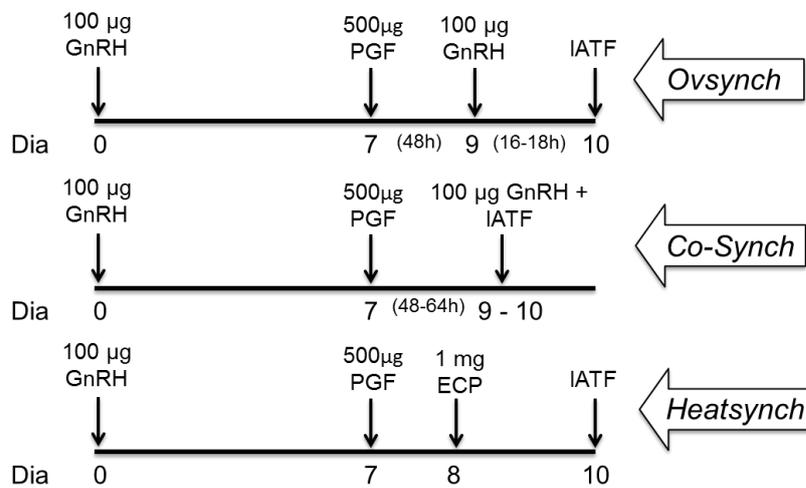
239

240 3.4. PROTOCOLOS A BASE DE GNRH

241 O primeiro protocolo que possibilitou o uso da IATF com satisfatória taxa de prenhez
242 (~50%) foi o *Ovsynch* (THATCHER et al., 1989; PURSLEY et al., 1995), desenvolvido na
243 década de 90. Esse protocolo consiste na aplicação de uma injeção de GnRH seguido de uma
244 dose de PGF 7 dias depois, e finalmente, outra dose de GnRH 48h após a PGF, seguido de
245 IATF 16-18 horas após a segunda dose de GnRH (Figura 1). O princípio desse protocolo
246 consiste em provocar a ovulação e formação de um corpo lúteo ou luteinização do folículo
247 dominante, para posterior luteólise com a aplicação de PGF. A segunda aplicação de GnRH
248 tem a finalidade de desencadear o processo ovulatório e, com isso, a ovulação sincronizada
249 (MORAES et al., 2002). De acordo com Pursley et al. (1995), a administração da segunda
250 injeção de GnRH proporciona a ovulação sincronizada dentro de um período de 8 h (de 24 a
251 32 horas após o segundo GnRH) em todas as vacas em lactação e novilhas nas quais houve
252 regressão do corpo lúteo em resposta à PGF. Entretanto, nos animais que não receberam a
253 segunda dose de GnRH as ovulações ocorrem em um período de 36 h (84-120 h após PGF)
254 (PURSLEY et al., 1995), demonstrando a necessidade de se utilizar um indutor de ovulação
255 ao final do protocolo para melhor sincronizar o momento das ovulações. Inicialmente, não se
256 utilizava nenhuma fonte de progesterona no protocolo *Ovsynch*; sendo assim, a associação de
257 um implante contendo progestágeno ao GnRH aplicado no Dia 0 foi uma importante
258 modificação feita neste protocolo, aumentando significativamente as taxas de fertilidade
259 (AMBROSE et al., 2005).

260 O protocolo *Co-Synch* é uma modificação do *Ovsynch*, em que a segunda dose de
261 GnRH é administrada no momento da IATF, 48 a 64 horas após o tratamento com PGF. O
262 *Co-Synch*, associado a uma fonte de progesterona, é o protocolo mais utilizado nos EUA, e

263 resulta em taxas de gestação que variam de 30 a 65% (KASIMANICKAM et al., 2006;
 264 BRIDGES et al., 2010). Outro protocolo desenvolvido a partir do *Ovsynch* foi o *Heatsynch*,
 265 em que ocorre a substituição da segunda dose de GnRH por cipionato de estradiol
 266 (PANCARCI et al., 2002; STEVENSON et al., 2004). Esse protocolo representou uma
 267 alternativa importante pelo fato de reduzir custo com manejo reprodutivo (uma dose de GnRH
 268 é cerca de 8 vezes mais cara do que uma dose de ECP) e induzir as manifestações do estro,
 269 como secreção mucovaginal e comportamento característico do cio quando administrado 24
 270 horas após a remoção do implante de progesterona (STEVENSON et al., 2004). Entretanto,
 271 este protocolo não é utilizado em países em que o uso do estradiol é proibido, como nos
 272 Estados Unidos e países da Comunidade Europeia.



274 **Figura 1.** Desenho ilustrativo dos protocolos hormonais de sincronização de cio e IATF *Ovsynch*, *Co-*
 275 *Synch* e *Heatsynch* utilizados em bovinos.

276 Existem, ainda, outras modificações feitas ao protocolo *Ovsynch*, como o *Select-Synch*
 277 (GEARY et al., 2000; DeJARNETTE et al., 2001), adaptado para vacas com cria ao pé, em
 278 que se insemina somente as que apresentarem cio após a segunda dose de GnRH. No
 279 protocolo *Pre-synch*, se faz uma “pré-sincronização” com PGF, em duas aplicações com 11-
 280 14 dias de intervalo e depois o protocolo é igual ao *Ovsynch*. Essas aplicações de PGF são
 281 feitas no intuito de aumentar a resposta folicular à primeira dose de GnRH e, assim, aumentar
 282 a taxa de prenhez (MORERIA et al., 2000; EL-ZARKOUNY et al., 2004). Este protocolo é
 283 indicado para vacas em pós-parto recente, pois favorece a reabsorção uterina.

284

285 3.5. LIMITAÇÕES DO USO DE ÉSTERES DE ESTRADIOL EM PRODUÇÃO
286 ANIMAL

287 Como mencionado anteriormente, os programas de sincronização de ovulação
288 utilizados no Brasil, bem como em diversos outros países, optam por administrar ésteres de
289 estradiol, tanto no início, como no final do protocolo, por seu baixo custo e alta eficiência.
290 Entretanto, apesar dos seus benefícios, o uso destes estrógenos, bem como de outros
291 hormônios usados em produção animal, tem sido amplamente discutido, principalmente no
292 que se refere a seguridade para humanos que ingerem derivados de animais tratados com
293 esses produtos.

294 Desde 1996, o conselho diretivo 96/22/EC da União Européia proíbe a administração
295 de substâncias que tenham efeitos tireostáticos, estrogênicos, androgênicos ou gestagênicos e
296 de Beta-agonistas na criação animal (COMUNIDADE EUROPEIA, 1996), enquanto que
297 algumas aplicações terapêuticas destas drogas ainda são permitidas. Particularmente o
298 estradiol-17 β , usado com o objetivo de promover crescimento animal e de controlar o ciclo
299 estral, foi considerado como um agente carcinogênico completo pelo Comitê científico no
300 Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH), pois exerce efeitos como agente
301 iniciador e como promotor de crescimento tumoral, sendo relacionado particularmente ao
302 câncer de mama em humanos. Apesar de os dados atualmente disponíveis não permitirem a
303 obtenção de uma estimativa quantitativa do risco, desde 2008, o Parlamento Europeu banuiu o
304 estradiol e seus ésteres, incluindo aqueles com fins terapêuticos, para assegurar a proteção da
305 saúde humana dentro da comunidade europeia.

306 Apesar de existirem diversos relatos que associam distúrbios hormonais ao uso de
307 hormônios esteroides na reprodução animal, não existem estudos epidemiológicos adequados
308 para averiguar se o consumo de alimentos com resíduos de ésteres de estradiol está envolvido
309 no risco desenvolvimento destes distúrbios. Além disso, é difícil determinar a quantidade de
310 resíduos dos ésteres de estradiol que permanecem na carne e no leite oriundos de animais
311 tratados. A literatura disponível leva-nos a crer que se o tratamento e o período de carência
312 forem seguidos corretamente, o nível destes hormônios no leite e na carne em animais
313 tratados, talvez sejam levemente maiores do que animais não tratados. Entretanto, a
314 concentração destes hormônios ainda estaria dentro das variações fisiológicas que os animais
315 naturalmente estão expostos durante o ciclo estral. De qualquer forma, a proibição quanto ao
316 uso de ésteres de estradiol, embora ainda não tenha sido efetuada em diversos países, como o
317 Brasil, não há garantias de que essas resoluções internacionais não afetem o Brasil, pois,

318 atualmente, o país ocupa uma posição estratégica e essencial na produção de alimentos para o
319 mundo.

320 Neste âmbito, nossos produtores e sistemas de produção podem estar à mercê de
321 embargos nas exportações e de acordos comerciais internacionais. Dessa forma, especial
322 atenção deve ser dada aos períodos de carência destes fármacos, pois não há nem mesmo
323 consistência no tempo de descarte do leite e da carne de um mesmo princípio ativo entre
324 diferentes fabricantes. Em uma simples busca nos compêndios veterinários e nas próprias
325 bulas dos ésteres de estradiol disponíveis no mercado brasileiro, os períodos de carência são
326 altamente heterogêneos (Tabela 1). Entretanto, geralmente o período de descarte para animais
327 tratados com benzoato de estradiol é de 30 dias para o leite e para o abate. Já para o cipionato
328 de estradiol, alguns laboratórios indicam que o período de carência é 0 (zero) tanto para o leite
329 quanto para o abate e outros que não indicam seu uso para animais de produção leiteira. De
330 qualquer forma, alternativas para o uso de ésteres de estradiol para o controle da onda
331 folicular e ovulação podem representar redução das perdas com o descarte do leite e a
332 produção de produtos mais saudáveis e seguros para o consumo humano.

333

334 **Tabela 1.** Indicação do período de carência informado na bula de produtos comerciais feitos
335 à base de análogos de 17- β Estradiol.

Nome Comercial	Tipo de éster de estradiol	Período de Carência	
		Abate	Leite
Gonadiol [®]	Benzoato de estradiol	60 dias	Não utilizar
Bioestrogen [®]	Benzoato de estradiol	10 dias	30 dias
Cronibest [®]	Benzoato de estradiol	10 dias	30 horas
Ric-BE [®]	Benzoato de estradiol	Não informa	Não informa
E.C.P. [®]	Cipionato de estradiol	zero	Não utilizar

336

337 Dessa forma, o Brasil, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo e o sexto
338 maior produtor de leite, deve estar conectado com as exigências mercadológicas do comércio
339 mundial de leite, carne e seus derivados, principalmente no que diz respeito aos mercados
340 nobres, que podem pagar melhor pelo produto. Desta forma, é necessário encontrar
341 alternativas para que além de atender as exigências do mercado externo, o Brasil ainda
342 continue produzindo proteína animal com alta competitividade e qualidade, sem que seja
343 necessário elevar consideravelmente os custos com protocolos reprodutivos, uma vez que para
344 se utilizar as duas doses de GnRH necessárias em um protocolo que não utiliza estradiol, o

345 custo é aproximadamente 8 vezes maior do que duas doses de estradiol. Por essa razão,
346 somada à questão residual e as proibições quanto ao uso do estradiol, se torna interessante a
347 elaboração de uma alternativa para viabilizar o uso da IATF que produza resultados
348 satisfatórios, sem a elevação excessiva nos custos.

349

350 3.6. A DUPLA FUNÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS

351 As prostaglandinas endógenas fazem parte de um grupo de compostos denominados
352 eicosanóides, derivados do ácido aracdônico, que são produzidos em praticamente todos os
353 tecidos animais, exercendo diversas funções (WEEMS et al., 2006; FERNANDES &
354 FIGUEIREDO, 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). A ação mais associada às
355 prostaglandinas é a indução de contrações ou relaxamento das células musculares lisas em
356 diversos órgãos (FERNANDES & FIGUEIREDO, 2007), sendo que a propriedade terapêutica
357 mais utilizada em medicina veterinária é a capacidade de algumas prostaglandinas da série F
358 provocarem a luteólise (TSAI & WILTBANK, 1997), causando a regressão morfológica e
359 funcional do CL (KOTWICA et al., 2002). Assim, na década de 70 vários compostos
360 análogos à Prostaglandina F₂α natural foram sintetizados, como o Cloprostenol (COOPER &
361 FURR, 1974). Mais tarde descobriu-se que o corpo lúteo só é responsivo à ação da PGF entre
362 os dias 5º e 17º dia do ciclo estral, a partir daí se inicia a regressão luteal espontânea pela ação
363 da PGF endógena (ODDE, 1990; LARSON, 1992). Essa descoberta resultou em melhores
364 taxas de ovulação, pois somente após a regressão luteal, o folículo dominante presente no
365 ovário adquire capacidade ovulatória (KASTELIC et al., 1990).

366 A aplicação da PGF possibilita maiores taxas de estro e de IA em comparação com
367 sistemas que utilizam apenas detecção do cio, entretanto, quando a PGF é administrada
368 isoladamente, o estro não ocorre de forma sincronizada, podendo se manifestar durante um
369 período de aproximadamente cinco dias. Assim, para a implantação de programas de IATF,
370 administração isolada de PGF (uma ou duas doses) se torna ineficiente. Por essa razão, a
371 maioria dos protocolos atualmente utilizados para a sincronização de cio e IATF utiliza
372 análogos de PGF associados a outros fármacos, como uma fonte de progesterona exógena e
373 indutores de ovulação, como os ésteres de estradiol, GnRH, eCG ou LH.

374 A ação luteolítica da PGF é conhecida desde a década de 70, e a partir desta descoberta,
375 as taxas de fertilidade dos animais melhorou consideravelmente, mas além das funções
376 anteriormente mencionadas, a PGF tem sido associada também à ovulação em diversas
377 espécies (BRIDGES & FORTUNE, 2007; DAVIES et al., 2006; PEIFER et al., 2009, 2014;

378 NEGLIA et al., 2012; LEONARDI et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a PGF
379 está diretamente ligada à ovulação em novilhas e vacas, atuando por um mecanismo
380 independente da luteólise (PFEIFER et al., 2009; 2014; LEONARDI et al., 2012). Entretanto,
381 o mecanismo pelo qual a PGF atua ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que diversos
382 estudos têm buscado compreender como ocorre a indução da ovulação pela PGF
383 (MURDOCH et al., 1993; RANDEL et al., 1996; NAOR et al., 2007; FORTUNE et al., 2009).

384 A primeira sugestão foi de que a PGF poderia estar envolvida na liberação de GnRH
385 (ZOR et al., 1970). Em seguida, diversos estudos relacionaram a administração exógena de
386 PGF ao aumento na liberação de LH em ovelhas (CARLSON et al., 1973), camundongos
387 (RATNER et al., 1974) e vacas pós-parto (RANDEL et al., 1988, 1996). Além disso, quando
388 utilizada em protocolos de sincronização de ovulação, associada à utilização de
389 progestágenos, a PGF pode potencializar os efeitos da progesterona exógena após a remoção
390 do progestágeno (PFEIFER et al., 2009), aumentando, assim, a capacidade de resposta da
391 hipófise ao GnRH (RANDEL et al., 1996) e induzindo a ovulação. Além disso, de acordo
392 com Weems et al. (2006), a PGF exerce um efeito direto sobre a hipófise anterior para
393 aumentar essa capacidade de resposta da hipófise, resultando, assim, na maior liberação de
394 LH (RANDEL et al., 1996). Entretanto, os efeitos da PGF sobre a secreção de LH são
395 controversos, pois embora a sua administração cause ovulação em vacas e ovelhas em anestro
396 (CRUZ et al., 1997; DAVIES et al., 2006), a relação com o aumento na liberação de LH é
397 citada apenas em vacas. Assim, diversos estudos indicam que a PGF pode atuar também
398 localmente, no ovário, para induzir a ovulação. De acordo com Murdoch et al. (1993), a
399 prostaglandina secretada pelo folículo pré-ovulatório está intimamente ligada com o processo
400 ovulatório. Como se sabe, as prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ são produzidas pelas células da
401 granulosa (BRIDGES & FORTUNE, 2003), agindo diretamente no folículo dominante.
402 Assim, pode-se considerar o fato de a PGF atuar de duas formas distintas, agindo sobre os
403 receptores de GnRH presentes na hipófise e também de forma direta nas células do folículo
404 pré-ovulatório. O fato é que a influência da PGF sobre a ovulação já foi comprovada, sendo
405 que em um estudo recente foi demonstrado que a PGF possui efeito semelhante ao do ECP e
406 BE na indução da ovulação de novilhas e vacas submetidas a protocolos de IATF baseados na
407 associação de progesterona intravaginal e BE, resultando inclusive, em taxas de gestação de
408 aproximadamente 50%, considerada uma porcentagem aceitável (PFEIFER et al., 2014).

409

410

411

4. ARTIGO 1

Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em vacas e búfalas leiteiras

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um análogo de Prostaglandina F2 α (PGF) como indutor de ovulação em vacas e búfalas leiteiras em lactação. No Experimento 1, 16 búfalas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE), i.m., no Dia 0 e um implante intravaginal de progesterona (CIDR) que permaneceu até o Dia 9. Nos Dias 8 e 9, as fêmeas receberam 500 μ g de d-Cloprostenol (análogo de PGF), i.m.. No Dia 10, as búfalas foram separadas em dois grupos para receberem 500 μ g de PGF (Grupo PG, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n =8). Não houve diferença entre os grupos na taxa de ovulação (P = 0,30), sendo que a taxa geral foi de 68%. Também não houve diferença entre os grupos no momento da ovulação (P = 0,61), sendo que o momento de ovulação médio foi de 89 horas após a remoção do CIDR. No Experimento 2, foram utilizadas 16 vacas lactantes, mestiças Girolando. No Dia 0, as vacas receberam 2 mg de BE e um CIDR que permaneceu até o Dia 8. Nos Dias 7 e 8, foi administrado 500 μ g de d-Cloprostenol, im. No Dia 9, as vacas foram separadas em dois grupos para receberem 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8). Apenas uma vaca, pertencente ao Grupo PG, não ovulou. Não houve diferença no momento da ovulação (P = 0,69) entre os Grupos CTL e PG, sendo que, em média, a ovulação ocorreu em 82 horas após a remoção do CIDR. Além disso, 87% das vacas ovularam de forma sincronizada, no período de 72 a 84 h após a remoção do CIDR, sem diferença entre os Grupos (P = 0,9). No Experimento 3, foram sincronizadas 16 vacas mestiças Girolando em lactação que foram tratadas de forma semelhante ao Experimento 2, entretanto, as vacas não receberam injeção de d-Cloprostenol no Dia 8. Todas as vacas ovularam e não houve diferença no diâmetro do folículo ovulatório (P = 0,34) entre os grupos CTL e PG. Vacas tratadas com PG ovularam mais cedo em relação ao Grupo CTL (62,5 \pm 5,8 vs 94,5 \pm 13,5 h; P = 0,05). Os resultados sugerem que a PGF antecipa a ovulação em vacas lactantes, entretanto, esse efeito não foi observado em búfalas lactantes.

Palavras-chave: Bovinos, bubalinos, controle estral, indutor ovulatório.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficiency of a Prostaglandin F_{2α} analogue (PGF) as ovulatory stimulus in dairy cows and buffaloes. In Experiment 1, 16 lactating dairy buffaloes received a 2 mg estradiol benzoate (EB) im, on Day 0. A progesterone-releasing device (CIDR) was intravaginally placed from Day 0 to Day 9. On Days 8 and 9 cows were given 500µg of d-Cloprostenol (PGF analogue), im. On Day 10, buffaloes were assigned into two groups to receive 500µg of PGF (PGF Group, n = 8) or no treatment (CTL Group, n = 8). There was no difference in ovulation rate (P = 0.30), on average 68%. Moreover, there was no difference between Groups in time of ovulation (P = 0.61), on average 89 h after the CIDR removal. In Experiment 2, 16 lactating dairy cows (Girolando crossbred), cows received 2 mg EB on Day 0. A CIDR was intravaginally placed from Day 0 to Day 8. On Days 7 and 8, cows were given 500µg of d-Cloprostenol. On Day 9, the cows were assigned into two groups to receive a 500µg of d-Cloprostenol (PGF Group, n = 8) or no treatment (CTL Group, n = 8). Only one cow from PG Group did not ovulate. There were no differences in the time of ovulation between CTL and PG Groups (P = 0.69), whereas, on average, ovulation occurred 82 h after CIDR removal. In addition, 87% of cows ovulated in a synchronized manner, within 72 and 84 h after CIDR removal. In Experiment 3, 16 lactating cows (Girolando crossbred) that were handled and treated similarly to the Experiment 2, however, the cows did not receive d-Cloprostenol on Day 8. All cows ovulated and there was no difference in the diameter of the ovulatory follicle (P = 0.34) between PGF and CTL Groups. Cows treated with PGF ovulated earlier than CTL Group (62.5 ± 5.8 vs 94.5 ± 13.5 h; P = 0.05). These results suggested that PGF hasten ovulation in lactating dairy cows, however its effect was not observed in dairy buffaloes.

466

Key-words: Cattle, Buffaloes, Control of Estrous Cycle, Ovulatory Stimulus.

468

Introdução

A sincronização da ovulação para viabilizar a Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF) é uma importante tecnologia implementada para aumentar a lucratividade de fazendas comerciais de bovinos e bubalinos, resultando no aumento na taxa de serviço, além de possibilitar que um grande número de fêmeas estejam gestantes logo no início da estação reprodutiva (BARUSELLI et al., 2002). Além disso, a IATF elimina a necessidade de observação de cio, que representa uma das principais limitações para o sucesso da

476 inseminação artificial, especialmente em bubalinos, em que a alta incidência de subestro ou
477 cio silencioso talvez seja o principal fator ligado a baixa eficiência reprodutiva (KANAI &
478 SHIMIZU 1983; PRAKASH, 2002; MADAN & PRAKASH, 2007). Em bubalinos, a
479 concentração de estradiol-17 β no sangue durante a fase folicular do ciclo estral parece ser
480 relativamente menor do que em bovinos (AVENELL et al., 1985; KANAI et al., 1990; ROY
481 & PRAKASH, 2009), sendo essa uma possível razão para a menor intensidade das
482 manifestações de estro em búfalas (PERERA, 2011). Assim, a inseminação artificial após
483 observação de cio se torna inviável nesta espécie.

484 Uma grande variedade de protocolos de sincronização de ovulação comprovadamente
485 eficientes para bovinos e que vem sendo adaptados para aplicação também em bubalinos
486 (BARUSELLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; CAMELO, 2002; BARUSELLI &
487 CARVALHO, 2005; ROLIM FILHO et al., 2009) tem sido utilizada no Brasil. Grande parte
488 dos protocolos incluem o uso de uma fonte exógena de progesterona, associada ao benzoato
489 de estradiol (BE) no início do tratamento para induzir a emergência de uma nova onda
490 folicular, um análogo de prostaglandina para induzir a regressão do corpo lúteo (CL) e um
491 indutor de ovulação, como o GnRH, cipionato de estradiol (ECP) ou BE. Búfalas parecem
492 não responderem adequadamente ao estradiol exógeno, portanto, nesta espécie se preconiza o
493 uso GnRH como estímulo ovulatório.

494 Embora os análogos de PGF sejam amplamente utilizados como agentes luteolíticos, a
495 secreção intrafolicular das prostaglandinas está intimamente relacionada com o período
496 periovulatório (SILVA & REEVES, 1985; ALGIRE et al., 1992; BRIDGES & FORTUNE,
497 2007). Além disso, estudos já demonstraram que a aplicação exógena de d-Cloprostenol
498 (análogo de PGF) induz a primeira ovulação em novilhas de corte (PFEIFER et al., 2009;
499 LEONARDI et al., 2012), sendo mais recentemente demonstrado que a PGF antecipa a
500 ovulação em novilhas púberes e em vacas lactantes submetidas a sincronização de ovulação
501 sem prejudicar a fertilidade dos protocolos de IATF (PFEIFER et al., 2014). Apesar dessas
502 comprovações, ainda não se tem estudos demonstrando o efeito da PGF na ovulação de
503 bubalinos.

504 Com base nas considerações apresentadas, a hipótese deste estudo foi que a
505 administração de um análogo de PGF 24 horas após a remoção da fonte de progesterona
506 exógena seria capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em vacas e búfalas leiteiras.
507 Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do d-Cloprostenol como indutor de
508 ovulação em vacas e búfalas leiteiras.

509

510 **Material e Métodos**

511 O estudo foi realizado entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014 e foi aprovado pelo
512 Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa – Rondônia, sob o código
513 F.02/2014.

514

515 *Experimento 1*

516 Este experimento foi conduzido no campo experimental do Centro de Pesquisa
517 Agroflorestal de Rondônia (Embrapa – Rondônia), situado no município de Presidente
518 Médici, RO, Brasil (11°10'33"S, 61°54'03"O). Para o estudo, foram utilizadas 16 búfalas
519 leiteiras mestiças (principalmente Murrah) em lactação, com idade entre 4 e 13 anos, mantidas
520 em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*, com livre acesso à água e sal mineral. As
521 vacas foram ordenhadas uma vez ao dia com bezerro ao pé.

522 O desenho experimental deste experimento está demonstrado na figura 1A. No Dia 0,
523 as búfalas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen[®], Biogénesis-Bagó,
524 Curitiba) i.m. e um implante intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, São
525 Paulo) que permaneceu até o Dia 9. Nos Dias 8 e 9 as fêmeas receberam 500µg de d-
526 Cloprostenol (análogo de PGF, Croniben[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba) i.m.. No Dia 10, as
527 búfalas foram separadas em dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do Folículo
528 Dominante (FD) para receberem 500µg de PGF (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento
529 (Grupo CTL, n = 8).

530

531 *Experimento 2*

532 Este estudo foi conduzido no campo experimental da Embrapa – Rondônia, situado no
533 município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S, 63°50'56" O). Dezesesseis vacas Girolando
534 (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) em lactação foram utilizadas no experimento. As vacas eram
535 mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv *Marandu*, sendo suplementadas com farelo
536 de milho e soja após cada ordenha (2 vezes ao dia). Os animais tinham livre acesso à água e
537 sal mineral.

538 O desenho experimental está ilustrado na figura 1B. No Dia 0, todas as vacas
539 receberam 2 mg, i.m., de BE e um implante intravaginal de progesterona que permaneceu até
540 o Dia 8. Nos Dias 7 e 8, foi administrado 500µg de d-Cloprostenol, im. No Dia 9, as vacas
541 foram separadas em dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do FD para receberem
542 500µg de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8).

543

544 *Experimento 3*

545 Neste estudo foram sincronizadas 16 vacas Girolando (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) em
546 lactação. Os animais foram tratados de forma similar aos do Experimento 2. O desenho
547 experimental está ilustrado na figura 1C. As vacas foram sincronizadas e separadas em
548 Grupos de forma semelhante ao Experimento 2, entretanto, todas vacas receberam uma
549 injeção luteolítica de d-Cloprostenol apenas no Dia 7. No Dia 9, as vacas foram separadas em
550 dois grupos homogêneos quanto ao diâmetro do FD para receberem 500µg de d-Cloprostenol
551 (Grupo PGF, n = 8) ou nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 8).

552

553 *Avaliações Ultrassonográficas e Definições*

554 Para determinar a atividade estral, as fêmeas foram examinadas por ultrassonografia
555 transretal (SIUI CTS-900, probe linear com 5 MHZ, Guangdong, China) previamente ao
556 início de cada experimento. Somente vacas que apresentavam um corpo lúteo (CL) e/ou um
557 folículo dominante (FD) foram consideradas com atividade estral e incluídas no estudo.
558 Durante os experimentos, o exame foi realizado para detectar a presença e diâmetro de todos
559 os folículos maiores ou iguais a 3 mm de diâmetro e do CL, bem como para avaliar a presença
560 de líquido uterino. Nos experimentos 1 e 2, os exames ultrassonográficos foram realizados a
561 cada 12 horas a partir do dia da retirada do CIDR até a detecção da ovulação ou até seis dias
562 após a remoção do implante intravaginal.

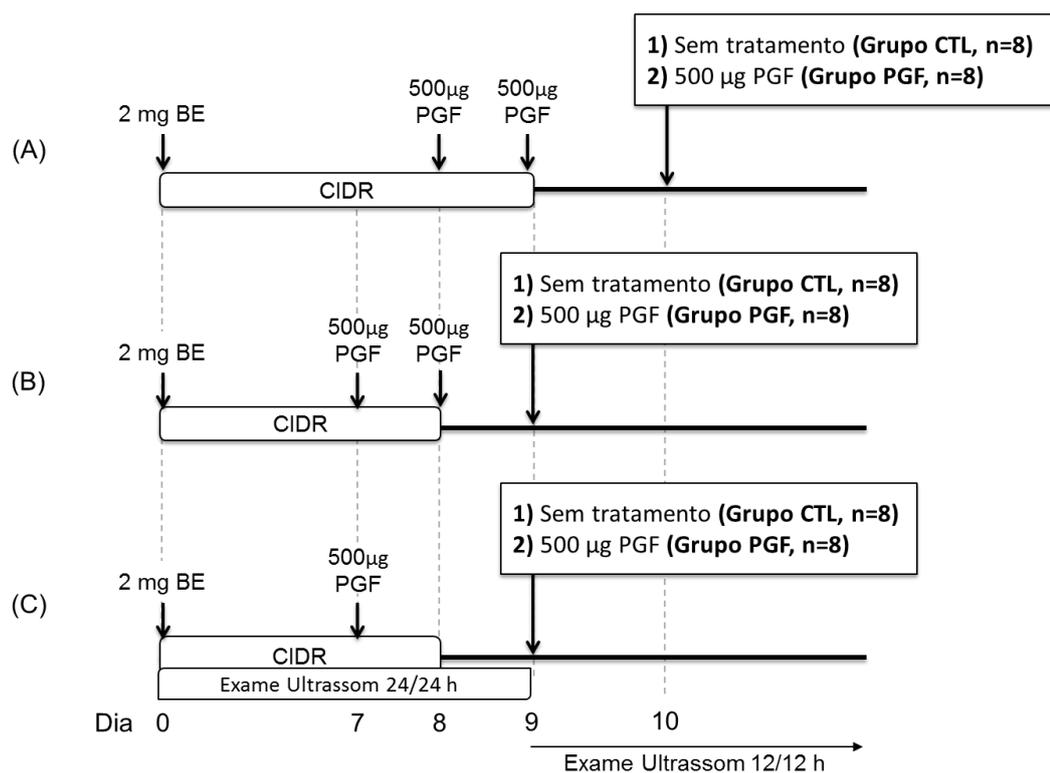
563 Com o objetivo de realizar a normalização dos dados de crescimento folicular
564 (GARCIA & SALAHEDDINE, 2001), no Experimento 3, as vacas foram monitoradas
565 diariamente do Dia 0 ao 8 e a cada exame era registrado o diâmetro e localização no ovário de
566 todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1989). A partir do Dia 8, o
567 monitoramento ultrassonográfico foi realizado a cada 12 horas, assim como nos Experimentos
568 1 e 2. Os exames diários foram feitos a fim de monitorar o desenvolvimento da onda folicular
569 de cada animal e o dia da emergência da onda folicular foi definida como retrospectivamente
570 como o dia em que o folículo dominante foi identificado pela primeira vez, com um diâmetro
571 de 4 a 5 mm (GINTHER et al., 1989; KNOPF et al., 1989). Em todos os experimentos, a
572 ovulação foi determinada pelo desaparecimento de um folículo maior ou igual a 8 mm de
573 diâmetro (MARTINEZ et al., 2005). A sincronia das ovulações foi determinada pela
574 porcentagem de fêmeas que ovularam dentro de um intervalo de 24 horas. Nas búfalas do
575 Experimento 1, foi definido que o intervalo seria entre 78 e 102 horas após a remoção do

576 implante de progesterona e nas vacas dos Experimentos 2 e 3, a ovulação sincronizada foi
 577 definida como as ovulações que ocorreram entre 60 e 84 horas após a remoção do implante.
 578

579 *Análises estatísticas*

580 Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS
 581 (1998). Os dados referentes a variáveis contínuas (diâmetro do folículo pré-ovulatório e
 582 momento da ovulação) foram avaliados por Análise de variância – Fatorial ANOVA, sendo as
 583 médias comparadas entre os grupos através do teste de Tukey. Já os dados de variáveis
 584 categóricas (taxas de ovulação, de ovulação sincronizada e de prenhez) foram analisados pelo
 585 teste do Qui-quadrado. A taxa de ovulação sincronizada foi calculada pelo número de vacas
 586 que ovularam dentro de uma janela de 24h sobre o total de ovulações. Os valores foram
 587 considerados significativos quando a probabilidade (valor de P) foi menor ou igual a 0,05.
 588 Quando o valor de P obtido foi entre 0,06 e 0,1, considerou-se uma tendência.

589



590

591 **Figura 1.** Desenhos experimentais utilizados nas (A) búfalas do Experimento 1 (n=16), (B)
 592 vacas do Experimento 2 (n=16) e (C) vacas do Experimento 3 (n = 16).

593

594 **Resultados**

595 *Experimento 1*

596 Os resultados referentes às respostas ovarianas estão descritos na tabela 1. Não houve
597 diferença quanto a taxa de ovulação ($P = 0,30$), em que a taxa geral foi de 68%. O momento
598 da ovulação também não diferiu entre os Grupos ($P = 0,61$), sendo que ocorreu, em média 89
599 horas após a remoção do CIDR. O diâmetro médio do folículo ovulatório foi de $15,7 \pm 0,9$
600 mm, sem diferença entre os Grupo PG e CTL ($P = 0,47$). A distribuição das ovulações está
601 demonstrada na figura 2A.

602 *Experimento 2*

603 Os resultados de resposta ovariana estão descritos na tabela 1. Apenas uma vaca, que
604 pertencia ao Grupo PGF, não ovulou durante o experimento. Não houve diferenças quanto ao
605 diâmetro do folículo ovulatório ($P = 0,79$), que foi em média $13,9 \pm 0,6$ mm. O momento da
606 ovulação ($P = 0,69$) e taxa de ovulação sincronizada ($P = 0,9$) também não diferiram entre os
607 Grupos CTL e PGF. A distribuição das ovulações está demonstrada na figura 2B.

608 *Experimento 3*

609 Os resultados das respostas ovarianas estão demonstrados na tabela 1. Todas as vacas
610 ovularam e não houve diferença no diâmetro do folículo ovulatório ($P = 0,34$) entre os grupos
611 CTL e PGF, respectivamente. As vacas tratadas com PGF ovularam antecipadamente em
612 relação ao Grupo CTL ($P = 0,05$). Houve uma tendência de maior sincronia de ovulações nas
613 vacas tratadas com PGF, em que 75% das ovulações ocorreram de forma sincronizada (entre
614 60 e 84h após a remoção do CIDR), enquanto que apenas 37,5% das vacas que ovularam do
615 grupo CTL ovularam nesse mesmo intervalo ($P = 0,1$).

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625 **Tabela 1.** Percentagem de búfalas (Experimento 1) e vacas (Experimento 2 e Experimento 3)
 626 que ovularam durante os tratamentos, taxa de ovulação sincronizada, média (\pm Erro Padrão)
 627 do momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e do diâmetro do
 628 folículo ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF (Grupo PGF) ou nenhum
 629 tratamento (Grupo CTL) 24 horas após a remoção do implante intravaginal de progesterona.

Respostas ovarianas	Grupo Experimental		
	CTL	PGF	Valor de P
Experimento 1 – Búfalas (PGD8D9D10)			
Taxa de ovulação	75% (6/8)	62,5% (5/8)	0,59
Taxa de ovulação sincronizada (78-102 h após a remoção do CIDR)	50% (3/6)	80% (4/5)	0,30
Momento da ovulação (h \pm EP)	92,0 \pm 8,6	85,2 \pm 9,5	0,61
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	16,25 \pm 0,8	15,3 \pm 0,9	0,47
Experimento 2 – Vacas (PGD7D8D9)			
Taxa de ovulação	100% (8/8)	87,5% (7/8)	0,30
Taxa de ovulação sincronizada (60-84 h após a remoção do CIDR)	87,5% (7/8)	85,7% (6/7)	0,9
Momento da ovulação (h \pm EP)	84,0 \pm 5,7	80,0 \pm 6,1	0,69
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	14,1 \pm 0,5	13,9 \pm 0,6	0,80
Experimento 3 – Vacas (PGD7D9)			
Taxa de ovulação	100% (8/8)	100% (8/8)	1
Taxa de ovulação sincronizada (60-84 h após a remoção do CIDR)	37,5% (3/8)	75% (5/7)	0,1
Momento da ovulação (h \pm EP)	94,5 \pm 10,4	62,5 \pm 10,4	0,05
Diâmetro do folículo ovulatório (mm \pm EP)	14,9 \pm 0,76	16,0 \pm 0,76	0,34

630

631 **Discussão**

632 A hipótese de que o d-Cloprostenol (análogo de PGF) administrado 24 horas após a
 633 remoção do implante de progesterona é capaz de induzir a ovulação em vacas e búfalas
 634 leiteiras foi parcialmente comprovada neste estudo. Os resultados obtidos demonstraram que a
 635 PGF é capaz de antecipar a ovulação, de forma sincronizada, em vacas leiteiras. Estes
 636 resultados concordam com estudos anteriores, em que foi demonstrado que PGF induz a
 637 ovulação sincronizada em vacas e novilhas submetidas a protocolos de sincronização de cio e
 638 IATF, resultando em taxa de gestação de aproximadamente 50% (PFEIFER et al., 2014).

639 Entretanto, aparentemente o tratamento com PGF não antecipou a ovulação em búfalas
640 leiteiras lactantes.

641 Diversos estudos têm buscado elucidar como a PGF atua para induzir a ovulação em
642 mamíferos (MURDOCH et al., 1993; RANDEL et al., 1996; BRIDGES & FORTUNE, 2007;
643 NAOR et al., 2007). Em um estudo realizado por Leonardi et al. (2012), novilhas pré-púberes
644 ovularam 94h após o tratamento com cloprostenol, sendo comprovado um efeito ovulatório
645 independente da luteólise. Entretanto, o mecanismo pelo qual a PGF atua ainda não é
646 conhecido. Aparentemente, a PGF aumenta a responsividade da hipófise ao GnRH,
647 aumentando, assim a liberação de LH (RANDEL et al., 1996) em um processo que culmina
648 com a ovulação. Randel et al. (1996) relatou um aumento na liberação de LH 6h após o
649 tratamento com um análogo de PGF em vacas em anestro. Entretanto, em outro estudo,
650 realizado com camundongos, foi demonstrado que a PGF inibe a secreção de LH pelas células
651 hipofisárias (NAOR et al., 2007). Essas considerações evidenciam a necessidade de mais
652 estudos para que o mecanismo de ação que leva a PGF a induzir a ovulação seja esclarecido.

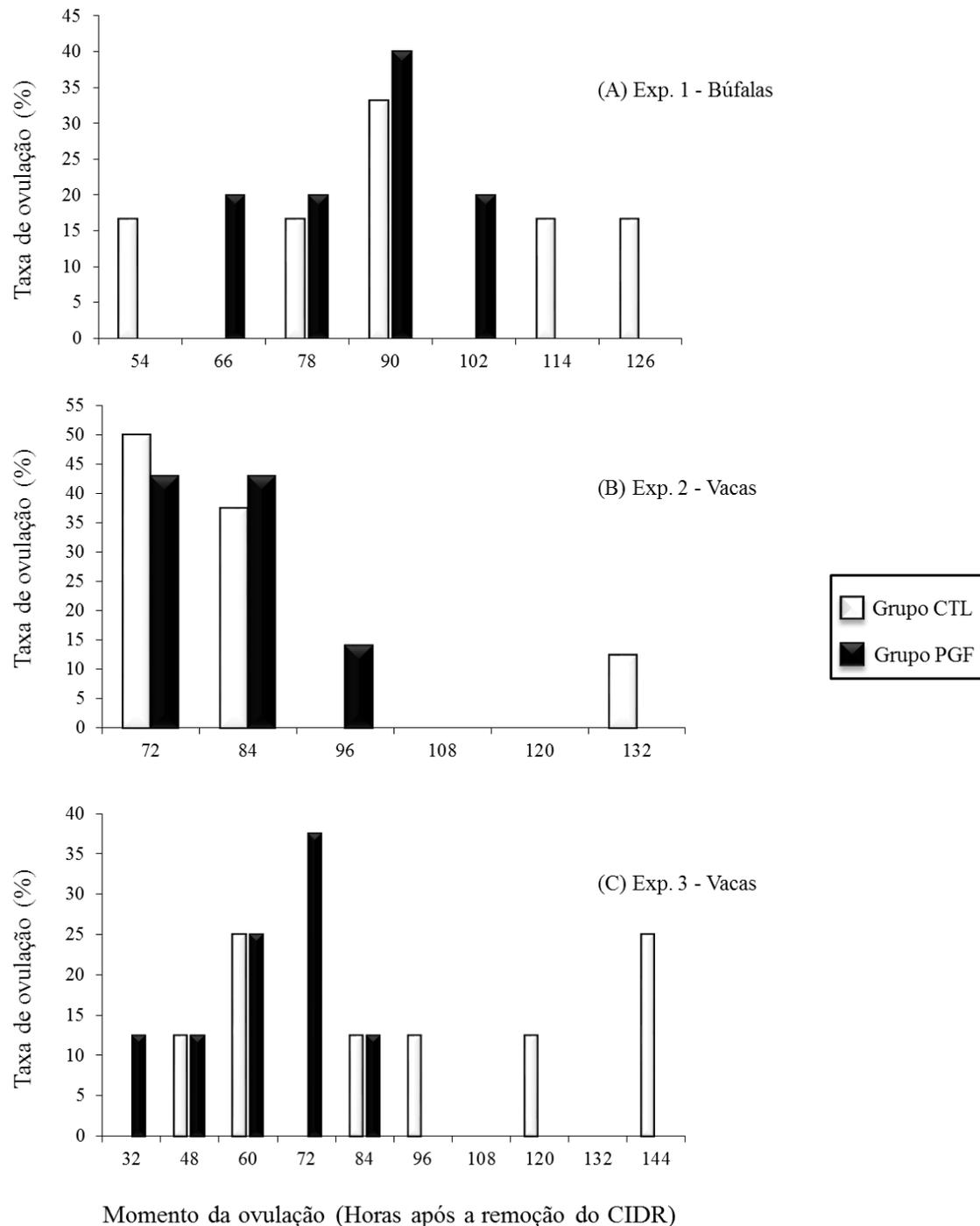
653 Apesar de não haver consenso quanto ao mecanismo de ação da PGF, aparentemente
654 qualquer análogo de prostaglandina possui potencial para induzir ovulação, sendo que vários
655 análogos comerciais já foram associados a eventos periovulatórios em bovinos (CRUZ et al.,
656 1997; GABRIEL et al., 2011; PFEIFER et al., 2009; 2014; LEONARDI et al., 2012), ovinos
657 (DAVIES et al., 2006) e também em bubalinos (NEGLIA et al., 2008, 2012). Em um estudo
658 prévio em que se relatou que a PGF atuava como estímulo ovulatório em vacas e novilhas
659 submetidas a um protocolo de IATF foi usado d-Cloprostenol e Cloprostenol sódico
660 (PFEIFER et al., 2014). No presente estudo foi utilizado d-Cloprostenol em todos os animais,
661 entretanto, os resultados demonstram que o efeito ovulatório só ocorreu em bovinos, sendo
662 nas búfalas constatado não haver efeito sobre a ovulação, mesmo naquelas que receberam três
663 doses do fármaco. No Experimento 2, em que todas as vacas receberam pelo menos duas
664 doses de PGF (Dias 7 e 8), a ovulação foi antecipada tanto nas vacas que receberam a terceira
665 dose (Dia 9), como naquelas que não receberam, não havendo diferença entre duas ou três
666 aplicações de PGF. Já no Experimento 3, em que as vacas receberam uma ou duas doses de
667 PGF, notou-se que a ovulação foi antecipada somente no grupo que recebeu a segunda dose,
668 ficando evidente a necessidade de fornecer um indutor de ovulação na fase final de
669 crescimento folicular.

670 A maioria dos protocolos de sincronização de ovulação utiliza a dose luteolítica de
671 PGF no momento da remoção da fonte de progesterona, entretanto, estudos indicam que a
672 antecipação dessa dose resulta em melhores taxas de fertilidade (MORENO et al., 2002;

673 VALDEZ et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2010). De acordo com Sá Filho et al. (2010), a
674 luteólise precoce leva a um aumento da pulsatilidade do LH, crescimento do folículo pré-
675 ovulatório, maior taxa de ovulação e maior diâmetro do CL formado.

676 Para que boas taxas de fertilidade sejam atingidas em programas de IATF, é necessário
677 que as ovulações ocorram de forma sincronizada na maior parte das fêmeas, em um intervalo
678 de 24 horas. No Experimento 1, em que não houve diferença em nenhuma das variáveis
679 analisadas, a percentagem de búfalas que ovularam foi baixa para os Grupos CTL e PGF,
680 respectivamente. Entretanto, quando o mesmo protocolo foi aplicado em vacas lactantes, a
681 taxa média de ovulação foi de 94% (15/16), sendo que apenas uma vaca não ovulou dentro do
682 intervalo de 60-84 h. Desta forma, aparentemente a PGF não produziu estímulo ovulatório nas
683 búfalas, ao contrário do que ocorreu com as vacas. Já no Experimento 3, foi detectada
684 diferença no momento da ovulação e uma tendência na porcentagem de vacas que ovularam
685 na janela de ovulação, sendo constatado a eficácia do estímulo ovulatório na fase final de
686 crescimento do folículo dominante.

687



688

689 **Figura 2.** Distribuição e porcentagem de (A) búfalas do Experimento 1 e vacas do (B)
 690 Experimento 2 e (C) do Experimento 3 que ovularam após a remoção do dispositivo
 691 intravaginal de progesterona nos Grupos PGF e CTL.

692

693 Embora os dados referentes ao uso da PGF para induzir ovulação em bubalinos não
 694 tenham sido favoráveis, os resultados apresentados para bovinos demonstram a possibilidade
 695 de mais uma alternativa de indutor de ovulação para ser utilizado em programas de IATF em

696 bovinos, concordando com estudos anteriores, em que se demonstrou esse mesmo efeito, sem
 697 afetar a fertilidade de novilhas e vacas (PFEIFER et al., 2014). Essa alternativa é interessante
 698 uma vez que a PGF, ao contrário dos estrógenos, amplamente utilizados em protocolos de
 699 sincronização de ovulação, não possui restrições comerciais. Desde 2008, o uso do estradiol-
 700 17 β em animais de produção foi proibido pela comunidade europeia por ter sido considerado
 701 um agente carcinogênico completo pelo Comitê sobre Medidas Veterinárias Relacionadas
 702 com a Ciência para Saúde Pública (SCVPH). No Brasil, embora não haja a proibição quanto
 703 ao uso de estrógenos em reprodução animal, o período de carência no leite pode chegar a 30
 704 dias, dependendo do produto comercial, pois seu uso pode ser um risco para a saúde humana.
 705 Assim, o uso da PGF pode ser uma alternativa em protocolos que utilizam GnRH, como
 706 forma de reduzir os custos com fármacos nos programas de IATF, particularmente nos países
 707 em que o uso de ésteres de estradiol é proibido (Diretiva 2008/97/EC). Entretanto, mais
 708 estudos devem ser conduzidos no intuito de avaliar o uso da PGF em búfalas.

709 Em suma, os resultados apresentados sugerem que a PGF é capaz de antecipar a
 710 ovulação em vacas leiteiras submetidas a um protocolo de IATF, entretanto, quando
 711 administrada em búfalas leiteiras, mesmo três doses de d-Cloprostenol não antecipou a
 712 ovulação. Assim, fica evidente a necessidade de realizar-se mais estudos acerca do
 713 mecanismo de ação da PGF, que leva a ovulação em vacas, mas não em búfalas.

714

715 Referências

716 ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R.
 717 Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle.
 718 **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 67–69, 1992.

719 AVENELL, J. A.; SEEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol 17 β
 720 and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around
 721 the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 74, p. 419-424, 1985.

722 BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-
 723 FILHO, J. R.; PORTO, R. Effecty of body condition score at calving on postpartum
 724 reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 53-65, 2001.

725 BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.;
 726 CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo
 727 fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução**
 728 **Animal**, v. 26, p. 218-221, 2002.

729 BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos
 730 (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p.4-17, 2005.

- 731 BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during
732 the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9,
733 2007.
- 734 CAMELO, A. S. A.; RIBEIRO, H. F. L.; SILVA, A. O. A.; SOUZA, J. S.; VALE, W. G.
735 Pregnancy rates in suckled female buffaloes submitted to estrous and ovulation
736 synchronization with artificial insemination in fixed time. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF
737 AMERICAS, 1., Pará, Brasil, 2002. **Proceedings...** Pará, Brasil, 2002, p. 482- 485.
- 738 COMUNIDADE EUROPEIA. 96/22/EC., C.D. **Official Journal European Community**;
739 L:125, 3-9, 1996.
- 740 COMUNIDADE EUROPEIA 2002/657/EC, C.D. **Official Journal European Community**;
741 L221, 8-36, 2002.
- 742 CRUZ, L.C.; DO VALLE, E.R.; KESLER, D.J. Effect of prostaglandin F2 alpha-and
743 gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and
744 corpus luteum function of beef cows. **Animal reproduction science**, v. 49, p.135-142, 1997.
- 745 DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.;
746 BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F(2alpha)
747 (PGF2alpha) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66,
748 p. 251-259, 2006.
- 749 GABRIEL, H.G.; WALLENHORST, S.; DIETRICH, E.; HOLTZ, W. The effect of
750 prostaglandin F(2alpha) administration at the time of insemination on the pregnancy rate of
751 dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p.1-4, 2011.
- 752 GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and
753 Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic**
754 **Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.
- 755 GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events
756 in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of**
757 **Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.
- 758 KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Characteristics of the estrous cycle of the Swamp buffalo under
759 temperate conditions. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 593–602, 1983.
- 760 KANAI, Y.; ABDUL-LATIEF, T.; ISHIKAWA, N.; SHIMIZU, H. Behavioural and
761 hormonal aspects of the oestrous cycle in swamp buffaloes reared under temperate conditions.
762 In: **Domestic Buffalo Production in Asia**. International Atomic Energy Agency, Vienna,
763 Austria, 1990, p. 113-120, 1990.
- 764 KNOFF, L; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular
765 dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual
766 follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.
- 767 LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.;
768 PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in
769 prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.
- 770 MADAN, M. L.; PRAKASH, B. S. Reproductive endocrinology and biotechnology
771 applications among buffaloes. In: **Reproduction in Domestic Ruminants VI** p. 261–281. Ed.

- 772 JUENGEL, J.I.; MURRAY, J.F.; SMITH, M.F. Smith. Nottingham University Press,
773 Nottingham, UK, 2007.
- 774 MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects
775 of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics
776 in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 37-52, 2005.
- 777 MORENO, D.; CUTAIA, L.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; VILLATA, M. L.; CACCIA,
778 M.; BO, G. A. Effect of time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo
779 recipients treated with progesterone vaginal devices and transferes without estrus detection.
780 **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 552-559, 2002.
- 781 MURDOCH, W. J.; HANSEN, T. R.; MCPHERSON, L. A. A review – role of eicosanoids in
782 vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85–115, 1993.
- 783 NAOR, Z.; JABBOUR, H. N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A. J.; MORGAN, K.;
784 BATTERSBY, S.; *et al.* Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone
785 (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential
786 gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524–537, 2007.
- 787 NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G.; SALZILLO, F.; ADINOLFI, L.; CAMPANILE,
788 G.; FRANCILO, M.; ZICARELLI, L. Effect of prostaglandin F₂alpha at the time of AI on
789 progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes.
790 **Theriogenology**, v. 69, p. 953-960, 2008.
- 791 NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R.; PACELLI, C.; COMIN, A.;
792 GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF(2alpha) on pre-ovulatory follicle and
793 corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 26-31,
794 Zuchthygiene, 2012.
- 795 OLIVEIRA, J. V. L.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.;
796 QUIRINO, C. R.; SALVADOR, D. F.; NOGUEIRA, L. A.G.; GUSMÃO, A. L. Efeito da
797 dosagem hormonal sobre a fertilidade e a função luteal de vacas zebus sincronizadas com
798 combinação de GnRH e Prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25,
799 p. 323-325, 2001.
- 800 PERERA, B.M.A.O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124,
801 p.194–199, 2011.
- 802 PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.;
803 COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular
804 development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64,
805 2009.
- 806 PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA,
807 L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF
808 2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p.
809 689-695, 2014.
- 810 PRAKASH, B. S. Influence of climate on animal reproduction. **National Workshop on**
811 **Animal-Climate Interaction**, IVRI, Izatnaga, April, 2002, p. 33–47.

- 812 RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE,
813 M.J. Exogenous PGF(2)alpha enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows.
814 **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.
- 815 ROLIM FILHO, S.T.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G.; PICANÇO, N.S.; BARBOSA, E.M.;
816 FERREIRA, R.N. Desempenho reprodutivo de fêmeas bubalinas criadas em sistema misto
817 (várzea e pastagem artificial) no estado do Pará. I. Idade a primeira cria, intervalo entre
818 partos, época de parição, eficiência reprodutiva e taxa de prenhez. **Revista Ciência Animal**
819 **Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 754-763, 2009.
- 820 ROY, K. S.; PRAKASH, B .S. Plasma progesterone, oestradiol-17 β and total oestrogen
821 profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers.
822 **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**,v. 93, p. 486-495, 2009
- 823 SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Inseminação artificial em tempo fixo. In:
824 **Bovinocultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1ª edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. CAP.
825 27, P. 259-546.
- 826 SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of**
827 **Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.
- 828
- 829
- 830
- 831
- 832
- 833
- 834
- 835
- 836
- 837
- 838
- 839
- 840
- 841
- 842
- 843

844 5. ARTIGO 2

845

846 **Avaliação da Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em protocolos**
847 **de IATF livres de estradiol**

848

849 **Resumo**

850 O objetivo deste estudo foi avaliar se um análogo de Prostaglandina F2 α (PGF) pode
851 substituir o cipionato de estradiol (ECP) como indutor de ovulação em protocolos de IATF a
852 base de GnRH e progesterona. No Experimento 1, em um delineamento cross-over (3 x 3), 13
853 vacas lactantes e 12 novilhas Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) receberam 100 μ g de
854 Lecirelina im, associada a um implante intravaginal de liberação de progesterona no Dia 0.
855 No Dia 7, o implante foi retirado e as fêmeas receberam 500 μ g de d-Cloprostenol (análogo
856 de PGF) im. No Dia 8, os animais foram distribuídos homogeneamente em três grupos
857 experimentais para receberem: 1) 2 mL de NaCl 0,9% im (Grupo CTL, n = 25), 2) 500 μ g de
858 d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) ou 3) 0,6 mg (novilhas) e 1 mg (vacas) de Cipionato de
859 Estradiol i.m. (Grupo ECP, n = 23). A taxa de ovulação não diferiu entre os tratamentos (P =
860 0,85). Entretanto, a percentagem de fêmeas que ovularam de forma sincronizada (72 a 96 h
861 após remoção do CIDR) foi maior no Grupo ECP do que no Grupo CTL (88 % vs. 45 %,
862 respectivamente; P = 0,02). O momento da ovulação não diferiu entre os Grupos, ocorrendo,
863 em média, 95 h após a remoção do implante de progesterona (P = 0,10). No Experimento 2,
864 32 vacas Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*), não lactantes, foram sincronizadas de forma
865 semelhante ao Experimento 1, entretanto a PGF foi aplicada 24 horas antes da remoção do
866 implante de progesterona (Dia 6), e não no Dia 7. No Dia 8, as vacas foram ordenadas de
867 acordo com o diâmetro do FD e receberam: 1) 2 ml de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 15) ou 2)
868 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 17). A taxa de ovulação foi maior no Grupo PGF
869 do que no Grupo CTL (P = 0,001). O momento da ovulação não diferiu entre os Grupos (P =
870 0,91). A porcentagem de vacas que ovularam de forma sincronizada (72 a 92 h após a
871 remoção do implante liberador de progesterona) tendeu a ser maior nas vacas do Grupo PG do
872 que no Grupo CTL (P = 0,1). Os resultados sugerem que apesar dos indutores hormonais PGF
873 e ECP não diferirem do grupo controle, o uso de PGF em vacas lactantes tendeu a aumentar a
874 sincronia das ovulações em relação aos animais que não foram induzidos a ovular. Desta
875 forma, existe potencial de uso para PGF ser utilizada como indutor de ovulação em protocolos
876 de IATF livres de estradiol.

877 **Palavras-chave:** Bovinos, Cipionato de estradiol, Prostaglandina, Estímulo ovulatório.

878 **Abstract**

879 The aim of this study was evaluate if prostaglandin F_{2α} analogue (PGF) can replace
880 estradiol cypionate (ECP) as ovulatory stimulus in GnRH-progesterone based TAI protocols.
881 In Experiment 1, in a cross-over design (3 x 3), 13 cows and 12 heifers Girolando (*Bos taurus*
882 vs. *Bos indicus*) were given 100 mg of Lecirelin im plus an intravaginal progesterone-release
883 device (CIDR) on Day 0. On Day 7, the device was removed, and the females were given 500
884 µg of D-cloprostenol (PGF analog) im. On Day 8, the animals were homogeneously allocated
885 into three groups to receive: 1) Saline (CTL Group, n = 25), 2) 500 mg of D-cloprostenol (PG
886 Group, n = 25) or 3) 0,6 mg (heifers) and 1 mg (cows) of estradiol cypionate im (ECP Group,
887 n = 23). The ovulation rate was not different among treatments (P = 0.85). However, the
888 percentage of females which ovulated synchronously (24 h interval; from 72 to 96 h after
889 CIDR removal) in the ECP Group was higher than in the CTL Group (88% vs 45%,
890 respectively; P = 0.02). Time of ovulation did not differ between Groups (P = 0.10). In
891 Experiment 2, 32 dairy cows, Girolando, were synchronized in a similarly to Experiment 1,
892 but the PGF was injected on Day 6. On Day 8, the cows were separated homogeneously to
893 receive: 1) saline 0.9% (CTL Group, n = 15) or 2) 500 mg of d-Cloprostenol (PG Group, n =
894 17). Ovulation rate was higher in the PGF Group than CTL Group (P = 0.001). The
895 percentage of cows that ovulated synchronously tended to be higher in the PG Group than
896 CTL Group (P = 0.07). In sum, although no difference in the time of ovulation was detected
897 among treatments, PGF and ECP induced ovulation in a synchronized manner. Therefore,
898 PGF might be a potential tool to induce ovulation in free estradiol TAI protocols.

899 **Key-words:** Cattle, Estradiol cypionate, Prostaglandin, Ovulatory stimulus.

900

901 **Introdução**

902 Os programas de controle do ciclo estral têm sido amplamente utilizados em rebanhos
903 leiteiros com o objetivo de sincronizar a onda folicular e a ovulação de vacas e novilhas.
904 Vários protocolos de sincronização de cio e ovulação já foram testados em gado leiteiro,
905 apresentando resultados satisfatórios (PURSLEY et al., 1997; SANTOS et al., 2004;
906 STEVENSON et al., 2004; RIVERA et al., 2005; PEREIRA et al., 2013). O protocolo
907 Ovsynch, baseado na associação de duas aplicações de GnRH (Dias 0 e 9) para sincronizar o
908 início da onda folicular e induzir a ovulação, respectivamente, e uma dose de prostaglandina

909 F2 α (PGF) no Dia 7, como fator luteolítico (PURSLEY et al., 1995), foi o primeiro que
910 permitiu que os animais fossem inseminados em tempo fixo, entretanto, ao longo das duas
911 últimas décadas, surgiram diversas modificações (PANCARCI et al., 2002;
912 KASIMANICKAM et al., 2006; SELLARS et al., 2006; YILMAZBAS-MECITOGLU et al.,
913 2014) no intuito de melhorar a eficiência e/ou reduzir os custos dos programas de IATF.

914 A associação de um implante de progesterona ao GnRH aplicado no Dia 0 foi uma das
915 alterações feitas no protocolo Ovsynch que resultou em um aumento significativo nas taxas de
916 fertilidade (AMBROSE et al., 2005). O desenvolvimento do protocolo Heatsynch, com a
917 substituição da segunda dose de GnRH por Cipionato de estradiol (ECP; PANCARCI et al.,
918 2002; STEVENSON et al., 2004) também representou uma alternativa importante pelo fato de
919 reduzir custo com manejo reprodutivo (STEVENSON et al., 2004). Entretanto, o uso de
920 ésteres de estradiol tem sofrido restrições, sendo proibido em diversos países, como os
921 pertencentes à União Europeia e os Estados Unidos. Dessa forma, novas alternativas devem
922 surgir para que se possa utilizar protocolos eficientes sem o uso de estradiol.

923 As prostaglandinas são ácidos graxos com diversas funções na reprodução animal
924 (WEEMS et al., 2006), e são utilizadas principalmente como agente luteolítico em protocolos
925 de IATF. Entretanto, estudos já demonstraram seu efeito sobre os níveis de LH em diversas
926 espécies (CARLSON et al., 1973; RATNER et al., 1974; RANDEL et al., 1988, 1996).
927 Recentemente, foi demonstrado que a aplicação de PGF é capaz de induzir a ovulação de
928 novilhas pré-púberes (PFEIFER et al., 2009; LEONARDI et al., 2012). Todavia, o mecanismo
929 de ação da PGF na ovulação ainda não foi esclarecido. Randel et al. (1996) sugeriram que a
930 PGF poderia aumentar a resposta da hipófise ao GnRH, resultando em aumento nos níveis
931 séricos de LH. Em um estudo recente, Pfeifer et al. (2014) comprovaram que a PGF pode ser
932 usada como indutor de ovulação em substituição a segunda dose de benzoato de estradiol
933 (BE) em protocolos de IATF, sem prejudicar a fertilidade. Apesar da PGF ser uma alternativa
934 para substituir os ésteres de estradiol como indutor de ovulação, ainda não há estudos que
935 demonstrem o efeito da PGF em protocolos livres de estradiol.

936 Baseado nessas considerações, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o perfil
937 ovulatório de vacas e novilhas leiteiras tratadas com um análogo de PGF em comparação com
938 o ECP usado no protocolo Heatsynch; e 2) avaliar se antecipação da luteólise melhora a
939 sincronização da ovulação em protocolos livres de estradiol que usam a PGF como indutor de
940 ovulação. A hipótese testada foi a de que a PGF induz a ovulação de vacas e novilhas
941 submetidas a protocolos livres de estradiol.

942 **Material e Métodos**

943 O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Embrapa – Rondônia aprovou
944 todos os procedimentos realizados neste estudo sob o código F.02/2014.

945 *Experimento 1*

946 Este estudo foi realizado no campo experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal
947 de Rondônia (Embrapa – Rondônia), no município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S,
948 63°50'56" O). Todos os animais eram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com
949 acesso livre à água e sal mineral e em períodos de estiagem as vacas eram suplementadas com
950 farelo de milho e soja após cada ordenha (2 vezes ao dia). Para o estudo, foram selecionadas
951 25 fêmeas bovinas leiteiras mestiças Girolando (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) sendo 12
952 novilhas púberes e 13 vacas em lactação. As novilhas tinham entre 16 e 24 meses de idade e
953 300 a 430 kg. As vacas apresentavam escore de condição corporal (CC) entre 2,5 e 3,5 (1 =
954 caquética, 5 = obesa), a partir de 45 dias em lactação e produção média diária de 15 litros/dia.
955 O Experimento foi delineado em Cross-over (3x3) (Figura 1A).

956 No Dia 0, todas as fêmeas receberam 100 µg de Lecirelina (análogo de GnRH, Gestran
957 plus[®], Tecnopec, São Paulo) im, e um implante intravaginal de liberação de progesterona
958 (CIDR[®], Pfizer Saúde Animal, São Paulo). No dia 7, o implante foi retirado e as fêmeas
959 receberam 500 µg de d-Cloprostenol (análogo de PGF, Croniben[®], Biogénesis-Bagó,
960 Curitiba) i.m.. No Dia 8, os animais foram distribuídos homogeneamente em três grupos
961 experimentais para receberem: 1) 2 mL de NaCl a 0,9% i.m. (Grupo CTL, n = 25), 2) 500 µg
962 de d-Cloprostenol (Grupo PG, n = 25) ou 3) 600µg (novilhas) e 1 mg (vacas) de Cipionato de
963 Estradiol (E.C.P.[®], Pfizer Saúde Animal, São Paulo) i.m. (Grupo ECP, n = 23).

964

965 *Experimento 2*

966 Este estudo foi realizado no campo experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal
967 de Rondônia (Embrapa – Rondônia), no município de Porto Velho, RO, Brasil (08°48'12" S,
968 63°50'56" O). Para o estudo, foram utilizadas 32 vacas leiteiras mestiças Girolando (*Bos*
969 *taurus* x *Bos indicus*) não lactantes, com CC entre 3,0 e 4,0. As vacas eram mantidas a pasto
970 com livre acesso a água. O desenho experimental está ilustrado na figura 1B. No Dia 0, todas
971 as vacas receberam um implante intravaginal de liberação de progesterona (CIDR) associado
972 a 100µg de Lecirelina im. No Dia 6, foi administrado 500 µg de d-Cloprostenol e 24 horas
973 após, o implante intravaginal foi removido. No Dia 8, as vacas foram distribuídas de acordo

974 com o diâmetro do FD em dois grupos homogêneos que receberam: 1) 2 mL de NaCl a 0,9%
975 (Grupo CTL, n = 15) ou 2) 500 µg de d-Cloprostenol (Grupo PGF, n = 17).

976

977 *Avaliações Ultrassonográficas e Definições*

978 Previamente ao início dos experimentos, as fêmeas foram examinadas, duas vezes em
979 um intervalo de 11 dias, por ultrassonografia transretal (SIUI CTS-900, probe linear com 5
980 MHZ, Guangdong, China) para determinar a atividade estral. Somente as vacas e novilhas que
981 apresentavam um corpo lúteo (CL) em pelo menos um dos exames foram utilizadas no estudo.

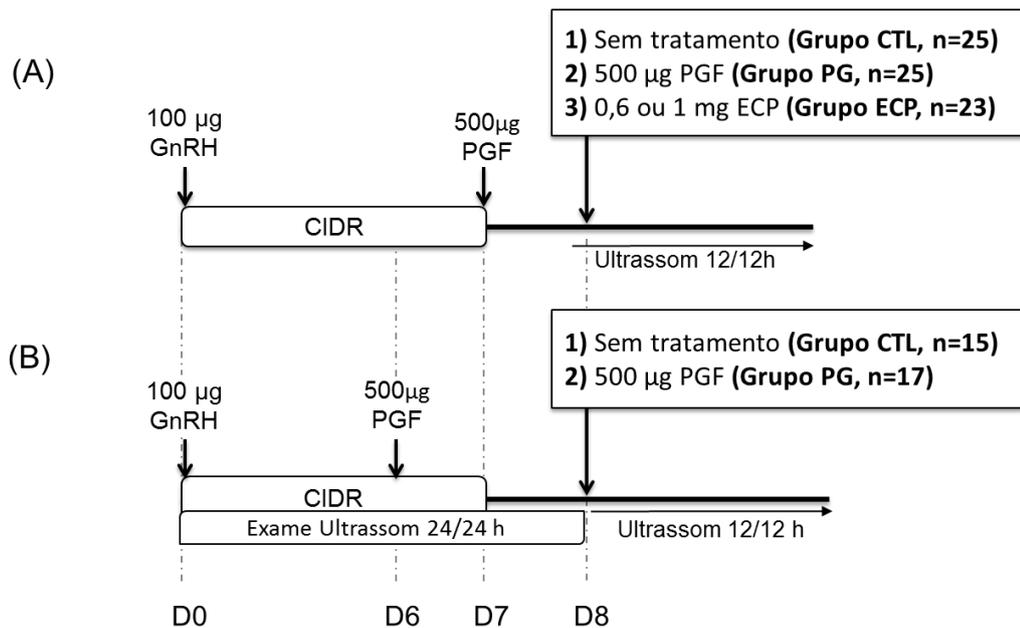
982 No Experimento 1, as fêmeas foram examinadas ultrassonograficamente no dia da
983 inserção (Dia 0) e da remoção (Dia 7) do implante intravaginal de progesterona. Após a
984 remoção do implante intravaginal, os exames foram feitos duas vezes ao dia até o momento
985 da ovulação ou, na ausência de ovulação, até cinco dias após a remoção do implante
986 intravaginal. Com o objetivo de realizar a normalização dos dados de crescimento folicular
987 (GARCIA & SALAHEDDINE, 2001), no Experimento 2, as vacas foram monitoradas
988 diariamente do Dia 0 ao 8 e a cada exame era registrado o diâmetro e localização no ovário de
989 todos os folículos ≥ 3 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1989). A partir do Dia 8, o
990 monitoramento ultrassonográfico foi realizado a cada 12 horas, assim como no Experimento
991 1. Os exames diários foram feitos a fim de monitorar o desenvolvimento da onda folicular de
992 cada animal e o dia da emergência da onda folicular foi definida como retrospectivamente
993 como o dia em que o folículo dominante foi identificado pela primeira vez, com um diâmetro
994 de 4 a 5 mm (GINTHER et al., 1989; KNOPF et al., 1989). Em ambos os experimentos, a
995 ovulação foi determinada pelo desaparecimento de um folículo maior ou igual a 8 mm de
996 diâmetro (MARTINEZ et al., 2005). A sincronia das ovulações foi determinada pela
997 porcentagem de fêmeas que ovularam dentro de um intervalo de 24 horas (72 a 96 h após a
998 remoção do implante de progesterona).

999 *Análises estatísticas*

1000 Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS
1001 (1998). Os dados referentes a variáveis contínuas (diâmetro do folículo pré-ovulatório e
1002 momento da ovulação) foram avaliados por Análise de variância – Fatorial ANOVA, sendo
1003 que as médias foram comparadas entre os grupos através do teste de Tukey. Já os dados
1004 referentes a variáveis binomiais (taxas de ovulação e ocorrência de ovulação sincronizada)
1005 foram avaliadas pelo teste do Qui-quadrado. No Experimento 1, análise de regressão logística
1006 foi utilizada para determinar o efeito do grupo, da categoria animal e a interação entre grupo e

1007 categoria sobre os resultados. A taxa de ovulação sincronizada foi calculada pelo número de
 1008 fêmeas que ovularam dentro do intervalo de 24 h (72 a 96h após a remoção do implante de
 1009 progesterona) pelo total de ovulações de cada Grupo. Os valores foram considerados
 1010 significativos quando a probabilidade (valor de P) foi menor ou igual a 0,05. Quando o valor
 1011 de P foi entre 0,06 e 0,1, considerou-se uma tendência de o resultado ser causado pelo
 1012 tratamento.

1013



1014

1015 **Figura 1.** Desenho experimental utilizado nas (A) novilhas e vacas leiteiras do Experimento 1
 1016 e (B) vacas leiteiras do Experimento 2.

1017

1018 Resultados

1019 Experimento 1

1020 Os resultados das respostas ovarianas de acordo com o tratamento estão descritos na
 1021 Tabela 1. Na última réplica do experimento, duas fêmeas (uma vaca e uma novilha) do Grupo
 1022 ECP apresentaram lesão na mucosa retal e, portanto, foram excluídas do experimento. As
 1023 fêmeas dos Grupos CTL e PG tiveram 80% de taxa de ovulação enquanto que as fêmeas que
 1024 receberam ECP tiveram 74% ($P = 0,23$). Entretanto, a porcentagem de fêmeas que ovularam
 1025 de forma sincronizada foi maior Grupo ECP (88%) do que no Grupo CTL (45 %; $P = 0,02$).
 1026 Do total de ovulações do Grupo PG, 70% ocorreram de forma sincronizada, não diferindo dos
 1027 demais grupos ($P > 0,05$). O momento de ovulação das fêmeas de acordo com o estímulo

1028 ovulatório está descrito na Figura 2. As fêmeas ovularam, em média, 95 horas após a remoção
1029 do implante de progesterona, não sendo detectada diferença entre os Grupos ($P > 0,05$).

1030 Nas vacas, o diâmetro do folículo pré-ovulatório foi maior nos Grupos CTL e PG do
1031 que no Grupo ECP ($P < 0,05$; Tabela 1). Ao desconsiderar a categoria animal, verificou-se
1032 que o diâmetro do folículo pré-ovulatório nas fêmeas que receberam tratamento com PGF não
1033 diferiu dos Grupos CTL e ECP, todavia, as fêmeas do Grupo CTL apresentaram maior
1034 diâmetro folicular do que as do Grupo ECP ($P = 0,002$).

1035

1036 **Tabela 1.** Momento da ovulação, taxas de ovulação e de ovulações sincronizadas e diâmetro
1037 do folículo ovulatório em vacas e novilhas leiteiras tratadas com 2 ml de NaCl a 0,9% (Grupo
1038 CTL, $n = 25$), 500 μ g de d-Cloprostenol (Grupo PG, $n = 25$) e 0,6 mg (novilhas) ou 1 mg
1039 (vacas) de Cipionato de estradiol (Grupo ECP, $n = 23$).

Respostas ovarianas	Tratamento			Valor de P		
	CTL	PG	ECP	Grupo	Categoria	Categ*Grupo
Momento da ovulação h (amplitude)*	101,0 \pm 4,7 (60 – 156 h)	96,0 \pm 4,6 (72 – 132 h)	86,1 \pm 5,0 (60 – 132h)	0,10	0,54	0,89
Taxa de ovulação	80% (20/25)	80% (20/25)	74% (17/23)	0,23	0,90	0,21
Taxa de ovulação sincronizada (72-96 h)	45% (9/20)	70% (14/20)	88% (15/17)	0,02	0,93	0,72
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)*	14,3 \pm 0,4 ^a	13,9 \pm 0,4 ^a	12,3 \pm 0,4 ^b	0,002	0,67	0,51

1040 ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam que as médias são diferentes entre si ($P \leq 0,05$).

1041 *Os dados estão apresentados em forma de Média \pm Erro Padrão.

1042

1043

1044 *Experimento 2*

1045 Os resultados das respostas ovarianas estão descritos na Tabela 2. O momento da
1046 ovulação não diferiu entre os Grupos ($P = 0,91$). A taxa de ovulação foi maior no Grupo PG
1047 do que no Grupo CTL [100 % (17/17) vs. 53 % (8/15), respectivamente; $P = 0,001$] e houve
1048 uma tendência de as ovulações ocorrerem de forma mais sincronizada nas vacas do Grupo PG
1049 do que no Grupo CTL ($P = 0,1$).

1050

1051

1052

1053

1054

1055 **Tabela 2.** Porcentagem de vacas que ovularam durante o tratamento, porcentagem de
 1056 ovulações sincronizadas, momento da ovulação (h após a remoção do implante intravaginal) e
 1057 diâmetro do folículo ovulatório em vacas que receberam tratamento com PGF (Grupo PG, n =
 1058 17) ou NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 15).

Respostas ovarianas	Grupo CTL	Grupo PG	Valor de P
Taxa de ovulação	53,3% (8/15)	100 % (17/17)	0,001
Taxa de ovulação sincronizada (72 – 96h)	37,5% (3/8)	70,6% (12/17)	0,10
Momento da ovulação (amplitude)	85,5 ± 7,18 (60 – 132 h)	86,6 ± 4,92 (72 – 120 h)	0,90
Diâmetro do folículo ovulatório*	14,3 ± 0,70	14,2 ± 0,56	0,90

1059 *Os dados estão apresentados em forma de Média ± Erro Padrão.

1060

1061 **Discussão**

1062 A hipótese de que a PGF seria capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em
 1063 um protocolo livre de estradiol foi parcialmente comprovada neste estudo. Entretanto, a sua
 1064 capacidade de induzir a ovulação em vacas e novilhas foi comprovada. A capacidade da PGF
 1065 de induzir a primeira ovulação em novilhas já foi demonstrada (PFEIFER et al., 2009;
 1066 LEONARDI et al., 2012). Além disso, a PGF já demonstrou ser um eficiente indutor de
 1067 ovulação quando comparado ao ECP e BE em programas de IATF (PFEIFER et al., 2014).
 1068 Entretanto, este é o primeiro estudo em que se utilizou PGF para sincronizar a ovulação em
 1069 um protocolo livre de estradiol.

1070 O ECP é um potente indutor de cio e ovulação, muito utilizado nos protocolos de
 1071 IATF aplicados no Brasil, sendo reportadas taxas de ovulação em torno de 80 % (GALVÃO
 1072 et al., 2004; STEVENSON et al., 2004). De forma semelhante, neste estudo, detectou-se taxa
 1073 de 74 % nas fêmeas tratadas com ECP (Experimento 1), sendo que as fêmeas tratadas com
 1074 PGF apresentaram 80% de ovulação. Como os resultados referentes a taxa e momento da
 1075 ovulação não diferiram entre as fêmeas que receberam ECP ou PGF, o Grupo ECP foi
 1076 excluído do Experimento 2.

1077 Entre as vantagens do uso de ésteres de estradiol 17-β estão a indução das
 1078 manifestações de cio e o baixo custo (STEVENSON et al., 2004), sendo esta a principal razão
 1079 para substituição da segunda dose de GnRH no protocolo *Ovsynch*. Devido a potente indução
 1080 do cio pelo ECP, o protocolo foi denominado *Heatsynch* (PANCARCI et al., 2002;
 1081 STEVENSON et al., 2004). Entretanto, é observado que muitas vezes a manifestação do cio
 1082 causado por ésteres de estradiol não é seguida de ovulação, sendo o “falso cio” uma das
 1083 limitações ao uso destes fármacos. Além disso, devido ao seu poder residual em produtos

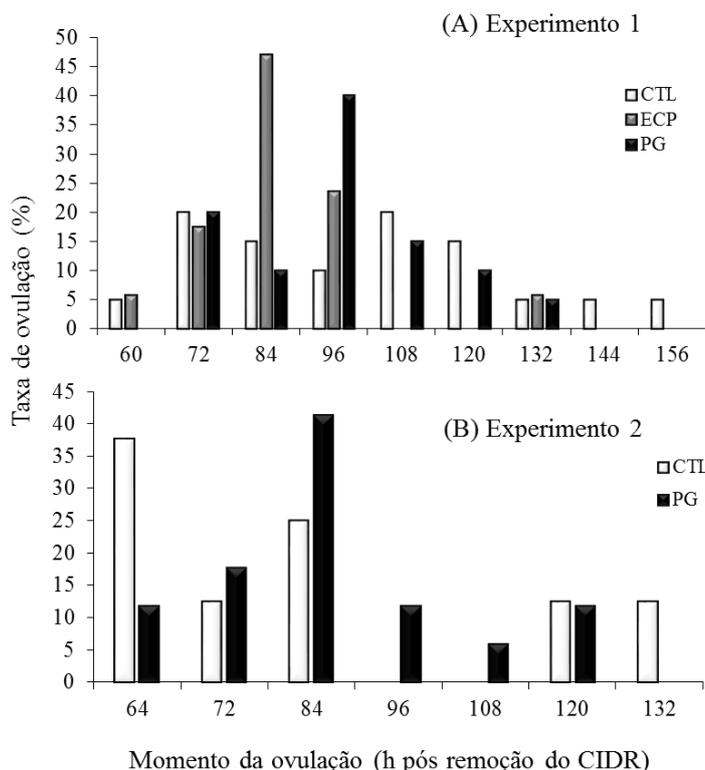
1084 carneos e lácteos, o uso de estradiol e seus ésteres em produção animal é proibido em alguns
1085 países, impossibilitando a aplicação do protocolo *Heatsynch* (SCHMIDT et al., 2013). Por
1086 essa razão é necessário que protocolos livres de estradiol e de baixo custo sejam
1087 desenvolvidos.

1088 A Prostaglandina F2 α é um eicosanoide derivado do ácido aracdônico amplamente
1089 utilizado em reprodução animal e muito estudado por suas variadas ações (WEEMS et al.,
1090 2006). Diversos estudos já demonstraram a associação da PGF exógena ao aumento nas
1091 concentrações de LH em ovelhas (CARLSON et al., 1973), camundongos (RATNER et al.,
1092 1974) e vacas (RANDEL et al., 1996). Embora já seja bem estabelecido que a produção de
1093 PGF produzida pelo FD é essencial para a ovulação em ruminantes (SILVA & REEVES
1094 1985; MURDOCH et al., 1986, ALGIRE et al., 1992), o mecanismo exato pelo qual a PGF
1095 induz a ovulação ainda não foi esclarecido. Entretanto, Randel et al. (1996) sugeriram que a
1096 ação ocorre no eixo hipófise-hipotálamo, em que a PGF induz um aumento da capacidade de
1097 resposta da hipófise ao GnRH liberado pelo hipotálamo, estimulando a maior liberação de
1098 LH, que culminará na ovulação. Em outro estudo, foi sugerido que a PGF produz um efeito
1099 direto na adenohipófise (WEEMS, 2006). Já foi demonstrado as prostaglandinas são
1100 mediadores intraovarianos de alguns eventos periovulatórios relacionados com o pico de
1101 gonadotropina (MURDOCH & McCORMICK, 1993), parecendo desempenhar um papel
1102 crítico na ruptura folicular. Ao trabalhar com ovelhas em anestro, Davies et al. (2006)
1103 sugeriram que a PGF exógena causa ovulação por um efeito direto da PGF a nível ovariano,
1104 sem relação com o declínio nas concentrações de progesterona.

1105 Em um programa de sincronização de ovulação para IATF, um fator essencial para o
1106 sucesso dos resultados é a percentagem de fêmeas que ovulam dentro de um pequeno
1107 intervalo, que pode variar de acordo com o protocolo estabelecido. De acordo com Saacke
1108 (2008), a ovulação ocorre cerca de 30 horas após o início do cio, sendo que o momento mais
1109 adequado para a inseminação é 24 horas após o início do cio, que corresponderá a cerca 6
1110 horas antes da ovulação, pois nesse momento, tanto a taxa de fertilização como a qualidade
1111 embrionária serão otimizadas. Em um trabalho com novilhas da raça Holandês, Garcia e
1112 Salahedine (2001) estabeleceram que a sincronia na ovulação é definida como a proporção de
1113 fêmeas que ovularam entre 60 e 84 horas após a remoção do implante de progesterona e
1114 injeção de prostaglandina em um protocolo baseado no uso de estradiol e progesterona. O
1115 momento mais adequado pode variar de acordo com o protocolo aplicado, entretanto, a
1116 maioria das ovulações devem ocorrer dentro de um intervalo máximo de 24 horas. No
1117 Experimento 2, em protocolos livre de estradiol, as vacas que receberam tratamento com PGF

1118 tenderam a ovular de forma mais sincronizada do que as vacas que não receberam estímulo
 1119 ovulatório. Conforme mostra a Figura 2, apenas duas vacas do Grupo CTL ovularam em um
 1120 intervalo de 24 horas, correspondente ao intervalo de 72 a 96 horas, o qual consideramos ideal
 1121 para este protocolo.

1122 De acordo com Macmillan & Peterson (1993) a taxa de desenvolvimento folicular
 1123 após a indução do declínio nos níveis de progesterona plasmática constitui o principal fator
 1124 limitante para que ocorra sincronia entre o estro e a ovulação. Dessa forma, a indução da
 1125 luteólise previamente a remoção do implante intravaginal permite a aceleração no declínio de
 1126 progesterona, favorecendo o desenvolvimento do folículo dominante. A luteólise precoce leva
 1127 a um aumento da pulsatilidade do LH, do crescimento do folículo pré-ovulatório, maior taxa
 1128 de ovulação e maior diâmetro do CL formado (SÁ FILHO & VASCONCELOS, 2010).
 1129 Assim, no Experimento 2, se preconizou que a dose luteolítica de PGF fosse antecipada em
 1130 um dia para potencializar a ação ovulatória da segunda dose de PGF. Assim, constatou-se que
 1131 aparentemente houve maior sincronia nas ovulações, em comparação com o experimento em
 1132 que a PGF foi administrada no momento da retirada da fonte de progesterona.



1133

1134 **Figura 2.** Percentagem e distribuição do momento da ovulação de fêmeas *Bos taurus* vs. *Bos indicus*
 1135 leiteiras tratadas com (A) 2 mL de NaCl 0,9% (Grupo CTL, n = 25), 500µg de d-Cloprostenol (Grupo
 1136 PG, n = 25) e 600µg (novilhas) ou 1 mg (vacas) de Cipionato de estradiol no Experimento 1 e (B)

1137 nenhum tratamento (Grupo CTL, n = 15) ou 500 µg de de Cloprostenol (Grupo PG, n = 17) no
1138 Experimento 2.

1139

1140 No Experimento 1, tanto as vacas que receberam PGF para induzir a ovulação como as
1141 que não receberam nenhum estímulo ovulatório apresentaram maior diâmetro do folículo
1142 ovulatório do que as fêmeas que receberam ECP. Em um estudo realizado para avaliar o
1143 efeito da PGF como indutor de ovulação em vacas e novilhas leiteiras submetidas a IATF com
1144 o uso de um protocolo baseado na associação de progesterona e BE no Dia 0, Pfeifer et al.
1145 (2014) também relataram menor diâmetro do folículo ovulatório naquelas que receberam BE
1146 ou ECP como indutor de ovulação em comparação com novilhas tratadas com PGF, sendo
1147 essa diferença atribuída ao mecanismo de ação de cada indutor de ovulação (PFEIFER et al.,
1148 2014). No presente estudo, nas fêmeas que não receberam estímulo ovulatório, a ovulação
1149 ocorreu de forma natural, enquanto que a administração exógena do ECP resulta na ovulação
1150 por um mecanismo de antecipação do pico de LH (LAMMOGLIA et al., 1998), antecipando a
1151 ovulação. Por outro lado, embora o mecanismo pelo qual a PGF induz a ovulação ainda não
1152 esteja claro, provavelmente a PGF permite o crescimento do folículo por um período mais
1153 longo do que o que ocorre com o éster de estradiol (PFEIFER et al., 2014).

1154 Neste estudo, buscou-se uma alternativa para que os ésteres de estradiol fossem
1155 retirados dos protocolos de sincronização de cio utilizados no Brasil. Os protocolos baseados
1156 na sequência de GnRH + P4, PGF, GnRH são atualmente os mais utilizados nos rebanhos
1157 leiteiros dos Estados Unidos e nos países da Europa. Esse fato se deve à restrição na utilização
1158 de estrógenos naqueles países, sendo bastante discutida em produção animal, principalmente
1159 no que se refere a segurança alimentar. Embora não haja estudos que demonstrem os efeitos, a
1160 longo prazo, da ingestão de alimento de origem animal contendo resíduos de estradiol-17β ou
1161 de seus ésteres, o Comitê Científico do Veterinary Measures relating to Public Health
1162 (SCVPH) considerou que este estrógeno, quando usado com o objetivo de promover
1163 crescimento animal e de controlar o ciclo estral, atua como um agente carcinogênico
1164 completo, pois tem efeito como iniciador e promotor de crescimento tumoral. Dessa forma, o
1165 uso de estradiol-17α e seus ésteres foi proibido em diversos países, como os da União
1166 Europeia (COMUNIDADE EUROPEIA, 2002) e os Estados Unidos, incluindo aqueles com
1167 fins terapêuticos.

1168 Dessa forma, mesmo que o uso do estradiol ainda seja permitido em alguns países,
1169 como o Brasil, a alternativa de substituí-lo por análogos de PGF se torna promissora, pois
1170 favorece competitividade dos produtos de origem animal perante o mercado mundial. Além

1171 disso, conforme consta na bula de alguns produtos comerciais à base de estradiol, existe um
 1172 período de carência muito variável, talvez pela falta de informações acerca dos efeitos dos
 1173 resíduos, especialmente no leite de vacas tratadas com estradiol, podendo esse período ser de
 1174 até 30 dias. Se esse período fosse respeitado, isso representaria um considerável prejuízo com
 1175 o descarte de leite. Desta forma, os protocolos livres de estradiol e que utilizam PGF para
 1176 induzir a ovulação demonstram ser promissores, pois no presente estudo, protocolos que
 1177 utilizaram PGF não diferiram dos protocolos que utilizam ECP como indutor de ovulação.
 1178 Entretanto, mais estudos que avaliem a fertilidade devem ser realizados para comprovar a
 1179 eficiência desses protocolos em programas de IATF para rebanhos leiteiros.

1180 Em suma, a nossa hipótese de que a PGF pode ser usada para induzir a ovulação em
 1181 protocolos derivados de *Ovsynch* foi parcialmente comprovada. A PGF é capaz de substituir
 1182 os ésteres de estradiol, induzindo a ovulação de forma igualmente sincronizada, além de
 1183 permitir que o folículo pré-ovulatório atinja um diâmetro maior do que o que ocorre com o
 1184 ECP.

1185

1186 **Referências**

- 1187 ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R.
 1188 Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle.
 1189 **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 56, p. 67–69, 1992.
- 1190 CARLSON, J.C.; BARCIKOWSKI, B.; MCCRACKEN, J.A. PGF 2α and the release of LH in
 1191 sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 357-361, 1973.
- 1192 COMUNIDADE EUROPEIA, 2002/657/EC, C.D., Off J Eur Comm 2002; L221: p. 8-36.
- 1193 DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.;
 1194 BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F(2alpha)
 1195 (PGF2alpha) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66,
 1196 p. 251-259, 2006.
- 1197 GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and
 1198 Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic**
 1199 **Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.
- 1200 GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events
 1201 in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of**
 1202 **Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.
- 1203 KNOFF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular
 1204 dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual
 1205 follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.
- 1206 LAMB, G. C., J. S. STEVENSON, D.J. KESLER, H.A. GARVERICK, D. R. BROWN, B. E.
 1207 SALFEN. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F 2α

- 1208 for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.
1209 2253–2259, 2001.
- 1210 LAMMOGLIA MA, SHORT RE, BELLOWS SE, BELLOWS RA, MACNEIL MD, HAFS
1211 HD. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in
1212 peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-
1213 releasing insert and prostaglandin F₂α. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1662-1670,
1214 1998.
- 1215 LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.;
1216 PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F₂α promotes ovulation in
1217 prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.
- 1218 MACMILLAN, K.L.; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for
1219 cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rate and the treatment of
1220 post-partum anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 1-25, 1993.
- 1221 MURDOCH, W. J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E. A.; VINCENT, D. L.; INSKEEP,
1222 E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory
1223 mechanism of the ewe. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 1187–1194, 1986.
- 1224 MURDOCH, W.J.; McCORMICK, R.J. Mechanisms and physiological implications of
1225 leucocyte chemoattraction into periovulatory ovine follicles. **Journal of Reproduction and
1226 Fertility**, v. 97, p. 375-380, 1993.
- 1227 PANCARCI, S.M.; JORDAN, E.R.; RISCO, C.A.; SCHOUTEN, M.J.; LOPES, F.L.;
1228 MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized
1229 timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85,
1230 p. 122–31, 2002.
- 1231 PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA,
1232 L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF
1233 2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p.
1234 689-695, 2014.
- 1235 PURSLEY, J. R., M. O. MEE, AND M. C. WILTBANK. Synchronization of ovulation in
1236 dairy cows using PGF₂a and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.
- 1237 PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of
1238 lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.
1239 2, p. 301-6, 1997.
- 1240 RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE,
1241 M.J. Exogenous PGF(2)α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows.
1242 **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.
- 1243 RATNER A, WILSON MC, STRIVASTAVA L, PEAKE GR. Stimulatory effect of PGE, on
1244 rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p.
1245 165-171, 1974.
- 1246 SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, n.70, p.
1247 479-484, 2008
- 1248 SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Inseminação artificial em tempo fixo. In:
1249 **Bovinocultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1º edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. cap. 27,
1250 p. 529-546.

- 1251 SCHMIDT, C.; GAJEWSKI, Z.; WEHREND, A. Strategische hormonelle
1252 Fruchtbarkeitsprogramme bei Kühen. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, n. 1, 2013.
- 1253 SELLARS, C.B.; DALTON, J.C.; MANZO, R.; DAY, J.; AHMADZADEH, A. Time and
1254 incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a
1255 timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 620-626, 2006.
- 1256 SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of**
1257 **Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.
- 1258 STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; LUCY, M.C. Use of Estradiol Cypionate as a
1259 Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. **Journal of**
1260 **Dairy Science**, v. 87, p. 3298–3305, 2004.
- 1261 WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female
1262 farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.
- 1263 YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; KARAKAYA, E.; KESKIN, A.; GUMEN, A.; KOC,
1264 V.; OKUT, H. Comparison of synchronisation and fertility after different modifications of the
1265 ovsynch protocol in cyclic dairy cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 62, p. 64-73, 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, juntamente com os dados dos estudos apresentados, é possível afirmar que a Prostaglandina F_{2α} exógena induz a ovulação em novilhas e vacas. Além disso, o d-Cloprostenol, análogo testado nos experimentos deste estudo, pode ser uma alternativa viável para substituir o ECP usado nos protocolos *Heatsynch*, induzindo a ovulação de forma igualmente sincronizada, além de permitir que o folículo pré-ovulatório atinja um diâmetro maior do que o que ocorre com o ECP. Entretanto, neste estudo não foi possível verificar as taxas de gestação resultantes do protocolo proposto, sendo necessária a aplicação do mesmo em um rebanho comercial afim de que seja demonstrada a eficiência do protocolo.

A PGF é capaz de antecipar a ovulação em vacas leiteiras submetidas a um protocolo de IATF, entretanto, quando administrada em búfalas leiteiras, mesmo três doses de d-Cloprostenol não antecipou a ovulação. Assim, fica evidente a necessidade de realizar-se mais estudos acerca do mecanismo de ação da PGF, que leva a ovulação em vacas, mas não em búfalas.

A aplicação comercial de protocolos livres de ésteres de estradiol possibilitará que novas alternativas hormonais para inseminar novilhas e vacas em tempo-fixos estejam disponíveis para os profissionais que atuam no mercado e para difusão tecnológica. A obtenção destes resultados favorece a utilização de protocolos hormonais para controle do ciclo estral sem a dependência de ésteres de estradiol, proibidos nos mercados mais exigentes. Dessa forma, o sistema de produção pecuária pode estar mais conectado com as exigências mercadológicas internacionais e com uma produção mais sustentável e lucrativa. Além disso, a disponibilização de protocolos de IATF que utilizam PGF em substituição ao GnRH pode representar um preço mais competitivo para protocolos de IATF o que estimula o uso das tecnologias da reprodução, mesmo nos países em que o uso de ésteres de estradiol em produção animal ainda é permitido.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

- ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 56, p. 67–69, 1992.
- ANDERSON, L. H.; DAY, M. L. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol acetate. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2955-2961, 1994.
- AVENELL, J. A.; SEEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol 17 β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 74, p. 419-424, 1985.
- AYRES, H.; PENTEADO, L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 410, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-FILHO, J. R.; PORTO, R. Effecty of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 53-65, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproductive Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES M. O. Técnicas de manejo para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva em fêmeas *Bos indicus*. Botucatu: **Unesp**, 2004b.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; MARQUES, M.O.; PENTEADO, L.; BÓ, G.A. Aplicação integrada de programas de controle da ovulação e manejo reprodutivo em bovinos de corte em condições extensivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 7., Córdoba. **Anais...** Córdoba: IRAC – Instituto de Reproducción Animal, 2007, v. 1, p. 55-79.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animmal**, v.29, p.4-17, 2005.
- BIHEL, M. V. **Avaliação de estratégias para aumentar a fertilidade de fêmeas nelore submetidas a protocolos de sincronização**. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.
- BÓ, G.A., ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, CUTAIA, D.L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H., MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, n.57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal and Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em 23 jul 2013.

BRIDGES, P.J., LEWIS, P.E., WAGNER, W.R. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p.573- 583, 1999.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Progesterone mediates gonadotrophin-induced secretion of prostaglandins E and F_{2a} (PGE, PGF) by follicular cells from bovine preovulatory follicles [Abstract]. **Biology of Reproduction**, v. 68 (Suppl 1), p. 47, 2003.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9, 2007.

BRIDGES, G.A.; DAY, M.L.; PIRES, A. V. Aspectos fisiológicos da reprodução de fêmeas bovinas e otimização da sincronização do estro e da ovulação, In: **PIRES, A. V. Bovinocultura de Corte. Piracicaba: FEALQ**, Cap. 34, p. 667-682, Piracicaba, 2010.

BURKE, C.R.; DAY, M.L.; BUNT, C.R.; MACMILLAN, K.L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 145-151, 2000.

COMUNIDADE EUROPEIA. 96/22/EC., C.D. **Official Journal European Community**; L:125, 3-9, 1996.

COMUNIDADE EUROPEIA 2002/657/EC, C.D. **Official Journal European Community**; L221, 8-36, 2002.

COOPER, M.J.; FURR, B.J. Control of oestrus cycle of heifers with synthetic prostaglandin analogue. **Veterinary Record**, v. 94, p. 61, 1974.

CRUZ, L.C; DO VALLE, E.R.; KESLER, D.J. Effect of prostaglandin F₂ alpha-and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 135-142, 1997.

DAVIES, K.L.; BARTLEWSKI, P.M.; EPP, T.; DUGGAVATHI, R.; BARRETT, D.M.; BAGU, E.T.; COOK, S.J.; RAWLINGS, N.C. Does injection of prostaglandin F₂(alpha) (PGF₂alpha) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? **Theriogenology**, v. 66, p. 251-259, 2006.

DEJARNETTE, J.M.; DAY, M.L.; HOUSE, R.B.; WALLACE, R.A.; MARSHALL, C.E. Effect of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronization of estrus using GnRH and PGF. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1675-1682, 2001.

DESCOUTEAUX, L.; COLLOTON, J.; GNEMMI, G. **Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasound.**, Ed. Wiley-Blackwel, 2010. ISBN-13:978-0-8138-1551-0/2010.

DOUGLAS, R.; GINTHER, O.J. Effect of prostaglandina F2 α on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, v. 2, p. 265-271, 1972.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; CARTMILL, J.A.; HENSLEY, B.A.; STEVENSON, J.S. Presynchronization of estrous cycles before Ovsynch and progesterone in dairy cows: Ovulation, pregnancy rates, and embryo survival. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 1024-1037, 2004.

FAOSTAT data. [2011]. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> Acesso em 22 de julho de 2013.

FERNANDES, A. C. F.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.406-414, jul./set. 2007. Acessado em 10 de fevereiro de 2014. Disponível em www.cbra.org.br

FORTUNE, J.E.; WILLIS, E.L.; BRIDGES, P.J.; YANG, C.S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, p. 60-71, 2009.

GARCIA, A.; SALAHEDINE, M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 β and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 301-307, 2001.

GEARY, T.W.; DOWNING, E.R.; BRUEMMER, J.E.; WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to Select Synch estrous synchronization protocol. **The Professional Animal Scientist**, v. 16, p. 1-5, 2000.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 223-230, 1989.

GOTTSCHALL, C. S. **Desmame de terneiros de corte. Como? Quando? Por quê?** Ed. Agropecuária, Guaíba. p. 139, 2002.

HUMBLOT, P.; GRIMARD, B.; MIALOT, J. P. Sources of variation of postpartumcyclicality, ovulation and pregnancy rates in suckled beef cows treated with progestagen and PMSG. **Proceedings of Society. Theriogenology Meeting**, Kansas City, USA, p.36-45.1996.

JOCHLE, W. Forty years of control of the oestrous cycle in ruminants: progress made, unresolved problems and the potential impact of sperm encapsulation technology. **Reproduction and Fertility Development**, v. 5, p. 587-594, 1993.

KASIMANICKAM, R.; COLLINS, J.C.; WUENSHELL, J.; CURRIN, J.C.; HALL, J.B.; WHITTIER, W. D. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 166-172, 2006.

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990.

KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animals Endocrinology**, v.6, p. 111-120, 1989.

KOTWICA J, BOGACKI M, REKAWIECKI R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 5341, p.1-10, 2002.

LAMMOGLIA MA, SHORT RE, BELLOWS SE, BELLOWS RA, MACNEIL MD, HAFS HD. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1662-1670, 1998.

LARSON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.

MACMILLAN, K.L.; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rate and the treatment of post-partum anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 1-25, 1993.

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

MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 2003, p. 392.

MARQUES, M.O.; AYRES, H.; REIS, E.L.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Efeito do Cipionato e do Benzoato de estradiol na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 32, p. 222. 2004.

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

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 37-52, 2005.

MCCRACKEN, J.A.; CARLSON, J.C.; GLEW, M.E.; GODING, J.R.; BAIRD, D.T.; GRÉEN, K.; SAMUELSSON, B. Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nature: New Biology**, v. 238, n.83, p. 129-134, 1972.

MIHM, M.; BAGUISI, A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 123-130, 1994.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Valera, São Paulo, 2002.

MOREIRA, F., ORLANDI, C.; RISCO, C.; LOPES, F.; LOPES; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: cyclic versus anestrus cows. **Journal of Animal Science**, v. 78(Suppl. 1), p. 134 (Abstr.), 2000.

MURDOCH, W. J.; PETERSON, T.A.; VAN KIRK, E. A.; VINCENT, D. L.; INSKEEP, E.K. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 1187-1194, 1986.

MURDOCH, W.J.; McCORMICK, R.J. Mechanisms and physiological implications of leucocyte chemoattraction into periovulatory ovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 375-380, 1993.

MURDOCH, W.J.; HANSEN, T.R.; MCPHERSON, L.A. A review - role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85-115, 1993.

NAOR, Z.; JABBOUR, H.N.; NAIDICH, M.; PAWSON, A. J.; MORGAN, K.; BATTERSBY, S.; MICHAEL, MILLAR, M.R.; BROWN, P.; MILLAR, R.P. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524-537, 2007.

NEBEL, R.L.; DRANSFIELD, M.G.; JOBST, S.M.; BAME, J.H. Automated electronic systems for detection of estrus and timing of AI in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.713-23, 2000.

NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R.; PACELLI, C.; COMIN, A.; GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF₂(alpha) on pre-ovulatory follicle and corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 26-31, Zuchthygiene, 2012.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 817-830, 1990.

PANCARCI, S.M.; JORDAN, E.R.; RISCO, C.A.; SCHOUTEN, M.J.; LOPES, F.L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.122–31, 2002.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINEZ, C.M.; GIMENES, L.U.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Variação na taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 260, 2005.

PEREIRA, M.H.; SANCHES, C.P.; GUIDA, T.G.; RODRIGUES, A.D.; ARAGON, F.L.; VERAS, M.B.; BORGES, P.T.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Timing of prostaglandin F₂α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2837-2846, 2013.

PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64, 2009.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF₂α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, 2014.

PURSLEY, J. R., M. O. MEE, AND M. C. WILTBANK. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.

PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-6, 1997.

RANDEL, R.D.; DEL VECCHIO, R.P.; NEUENDORFF, D.A.; PETERSON, L.A. Effect of alfaprostol on postpartum reproductive efficiency in Brahman and heifers. **Theriogenology**, v. 29, p. 657- 670, 1988.

RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF₂α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.

RATNER, A.; WILSON, M.C.; STRIVASTAVA, L.; PEAKE, G.R. Stimulatory effect of PGE₂ on rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p. 165-171, 1974.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIVERA, H.; LOPEZ, H.; FRICKE, P.M. Use of intravaginal progesterone-releasing inserts in a synchronization protocol before timed AI and for synchronizing return to estrus in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 957-968, 2005.

SACCKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 663–677, 2000.

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v.70, p. 479-484, 2008

SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Inseminação artificial em tempo fixo. In: **Bovinocultura de Corte**. Alexandre Vaz Pires. 1º edição, Piracicaba, FEALQ, 2010. cap. 27, p. 529-546.

SANTOS, J.E.; BARTOLOME, J.A.; CERRI, R.L.; JUCHEM, S.O.; HERNANDEZ, O.; TRIGG, T.; THATCHER, W.W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p. 421-435, 2004.

SCHMIDT, C.; GAJEWSKI, Z.; WEHREND, A. Strategische hormonelle Fruchtbarkeitsprogramme bei Kühen. **Tierärztliche Praxis Großtiere**, n. 1, 2013.

SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.

STEVENSON, J.S.; TIFFANY, S.M.; LUCY, M.C. Use of Estradiol Cypionate as a Substitute for GnRH in Protocols for Synchronizing Ovulation in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3298–3305, 2004.

THATCHER, W. W.; K. L., MACMILLAN; P. J., HANSEN; M, DROST. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, p.149, 1989.

TSAI, S.; WILTBANK, M.C. ProstaglandinF2 α induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1016-1022, 1997.

VASCONCELOS, J. L., R. SARTORI, H. N. OLIVEIRA, J. G. GUENTHER, AND M. C. WILTBANK. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307– 314, 2001.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; FERNANDES, C.A.C. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.257-262, 1999.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WILTBANK, J. N.; STURGES, J. C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D. G.; FAULKNER, L. D. Control of estrus and ovulation using subcutaneous implants and estrogens in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 33, n.3, p. 600-6, 1971.

ZIMBELMAN, R. G.; SMITH, L. W. Control of ovulation in cattle with melengestrol acetate. I. Effect of dosage and route of administration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 2, p. 185-91, 1996.

ZOR, A.; KANEKO, T.; SCHNEIDER, H.P.G.; MCCANN, S.M.; FIELD, J.B. Further studies on stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine-3,5'-monophosphate formation by the hypothalamic extract and prostaglandins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 2883-2885, 1970.