

IGOR GARCIA MOTTA

**Impactos do uso do estradiol na ressincronização superprecoce
aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte**

São Paulo
2019

IGOR GARCIA MOTTA

Impactos do uso do estradiol na ressincronização super-precoce aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Guilherme Pugliesi

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3843
FMVZ

Motta, Igor Garcia
Impactos do uso do estradiol na ressincronização superprecoce aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte / Igor Garcia Motta. – 2019.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Pugliesi.

1. Ressincronização. 2. Ultrassonografia Doppler. 3. Estradiol. 4. Luteólise. 5. Novilhas de corte. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da resincronização da ovulação com estradiol aos 14 dias pós-IATF sobre as características morfofuncionais do corpo lúteo e útero em fêmeas Nelore.", protocolada sob o CEUA nº 1608300817 (ID 004200), sob a responsabilidade de **Guilherme Pugliesi e equipe; Igor Garcia Motta** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/10/2017.

We certify that the proposal "Effects of estradiol on day 14 after timed-AI on morphofunctional characteristics of corpus luteum and uterus of Nelore females.", utilizing 1630 Bovines (1630 females), protocol number CEUA 1608300817 (ID 004200), under the responsibility of **Guilherme Pugliesi and team; Igor Garcia Motta** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/25/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2017](#) a [10/2017](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [24 a 36 meses](#)

N: [1630](#)

Linhagem: [Nelore](#)

Peso: [300 a 400 kg](#)

Local do experimento: Dependências do Departamento de Reprodução Animal

São Paulo, 07 de agosto de 2019

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOTTA, Igor Garcia

Título: Impactos do uso do estradiol na ressincronização superprecoce aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, **José Luiz Bressito Motta** e
Solange Maria Lucarelli Garcia Motta;
Aos meus irmãos **Rodrigo, Diego e Vitor**;
Ao meu tio **José Fernando Lucarelli Garcia**;
À minha namorada **Ana Carolina**.*

Dedico

Agradeço

Agradecer pode parecer fácil, entretanto, lembrar o nome de todos que nos ajudaram direta ou indiretamente durante esta caminhada se torna algo muito difícil, sendo assim, peço desculpas aos não mencionados.

Agradeço a **Deus**, por conceder-me o dom da vida e por colocar nela pessoas maravilhosas que possibilitaram ser quem eu sou hoje.

Agradeço em especial aos meus pais, **José Luiz** e **Solange**, os quais souberam colocar em meu coração um sentimento nobre chamado respeito. Dois anjos que sempre estiveram em meu lado, sendo os alicerces da minha vida. Meus espelhos! Meus amores! Agradeço pelo amor incondicional, compreensão e apoio durante toda esta trajetória. Pai e mãe, amo vocês!!

Aos meus irmãos, **Rodrigo**, **Diego** e às minhas cunhadas **Lorryne** e **Rayane** que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, mostrando a importância de não desistir dos meus sonhos. **Ray** e **Diego**, obrigado por nos dar o maior presente que foi o **Pietro**, esse menino lindo que cativa à todos com seu sorriso. Ao meu irmão caçula **Vitor** pelo apoio e incentivo sempre. Obrigado à vocês por toda parceria!!

Ao meu tio e padrinho "**Zeção**", que nunca vou chamar de tio, pois sempre lhe considerei como meu segundo pai. Sempre dedicando mais aos sobrinhos do que a si próprio. Obrigado pelas conversas, motivações, incentivos.

A minha namorada, melhor amiga e companheira **Ana Carolina**, que nunca mediu esforços para me ajudar, me apoiar, por ser sempre tão presente, mesmo estando tão longe. Obrigado amor!!

Aos meus avós maternos, **Vô Dito** e **Vó Patida**, *in memoriam*, que me mostraram a importância da palavra "FAMÍLIA". "Ditão" agradeço pela paciência, por me mostrar que só conseguimos vencer com muito trabalho, dedicação e humildade. Obrigado por me despertar o gosto pela terra, pelos animais, por ser minha fonte de inspiração diária. Vó Patida, a qual sempre me apoiou, me incentivou, me mostrou a importância dos estudos o que possibilitou eu chegar onde cheguei. Meus anjos divinos, que posso senti-los ao meu lado, e os levarei comigo sempre.

Aos meus avós paternos, **Vô Motta** e **Vó "Tutti"**, *in memoriam*, vô Motta obrigado pelas cavalgadas, as quais desfilámos juntos na "charretona", ao seu lado passei a admirar os animais principalmente os cavalos.

Ao meu orientador e amigo, Dr. **Guilherme Pugliesi**, por toda confiança, todo suporte, conhecimentos, paciência e compreensão durante esses dois anos.

Aos amigos da república Colméia, **Vitinho, Vicente, Tiago, Mauro, Julinha, Colômbia** e agregados, obrigado por me acolherem quando cheguei em Pirassununga, obrigado pelas inúmeras conversas, risadas, conselhos, ensinamentos. Os levarei sempre em meu coração!!

Aos amigos do LFEM, **Danilo, Cecília, Gabi, Gilmar, Amanda, Thaís, Pablo, Diego, Bruna, Tiago Nishimura, Leonardo, Everton, Angela, Bia, Thiago Martins, Mari**, obrigado por toda a ajuda, pelos conhecimentos compartilhados, pelo convívio diário e pelo crescimento pessoal e científico.

Aos amigos do VRA, **Léo “Bati”, Carol, Marina, Camila, Paty, Renata, Gabi, Bruno, Rogério, Egle, Dimitri, Felipe “Gangorra”, Fabio, Mari, Marcão, Walter “Tuba”, Guilherme “Gaúcho”, Flávia, Laís, Laísa, Damiana** por tornarem esta caminhada mais leve.

Aos amigos do LMMD, pela parceria nos projetos e pela confiança em mim depositada.

Aos funcionários do VRA, **Clayton e Harumi** por todos os esclarecimentos, pela disposição em ajudar, por tornarem as questões burocráticas mais simples e também ao **Márcio, João, Zé Maria**, pela ajuda com os animais, manejos e por nos proporcionar um ótimo ambiente de trabalho.

Às fazendas **Canaã, Cerro Alto, Duas Barras e Querência**, os funcionários e aos veterinários por abrirem as porteiras e me acolherem como seu eu fosse da família durante a execução do meu experimento.

Aos amigos veterinários **Neto, Igor, João Abdon, Fainer, João Vitor** por toda a ajuda e por viabilizarem a execução do segundo experimento.

Às empresas parceiras **Ourofino Saúde Animal e Boehringer Ingelheim** por disponibilizarem os produtos, utilizados para a realização dos experimentos, em nome de **Bruno Gonzales de Freitas e Kleber Menegon Lemes**.

À **FAPESP** pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida durante o mestrado (processo 2017/18613-0; 2015/10606-9).

À esta **universidade**, ao **VRA**, ao seu **corpo docente**, ao **PPGRA** que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe”
(Clarice Lispector)

RESUMO

MOTTA, IG. **Impactos do uso do estradiol na ressincronização superprecoce aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte.** [Impacts of estradiol use on super early resynchronization at 14 days post IATF in beef heifers]. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso do benzoato de estradiol (BE) ou 17 β -estradiol (E2) associado a P4 para ressincronização da ovulação aos 14 dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e seu efeito na manutenção da gestação em novilhas de corte. No Experimento 1, novilhas Nelore foram submetidas à IATF (D0). No D14, os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 e foram alocados em três grupos: controle (sem tratamento; n=17); BE (1mg de BE; n=17); e E2+P4 (1mg E2 + 9mg P4; n=18). Avaliações ultrassonográficas (modo B e Doppler) foram realizadas diariamente do D14 ao D22 para acompanhamento da dinâmica folicular e luteal. No D22, os dispositivos foram removidos e o provável diagnóstico gestacional foi realizado com ultrassonografia Doppler por meio da detecção da luteólise. No Experimento 2, 1178 novilhas Nelore e 117 novilhas cruzadas (Nelore x Angus) foram ressincronizadas conforme o Experimento 1 e divididas nos mesmos três grupos. No D22, o folículo dominante (FD) foi mensurado nas fêmeas não gestantes (NG) e a segunda IATF foi realizada no D24. Em um subgrupo de novilhas NG (n=337), um adesivo para detecção de cio foi usado entre D22 e D24 e o FD foi mensurado no D24. Os diagnósticos confirmatórios foram realizados entre D37-67 e 43-47 após a primeira e segunda IATF, respectivamente. No Experimento 1, a proporção de novilhas com emergência folicular sincronizada (3 a 5 dias após o tratamento) foi maior ($P < 0,05$) no grupo BE (93,8%) quando comparado ao controle (62,5%) e E2+P4 (64,7%). A luteólise ocorreu antes ($P < 0,05$) nos grupos BE ($18,6 \pm 0,5$ dias) e E2+P4 ($19,1 \pm 0,5$ dias) do que no controle ($20,6 \pm 0,4$ dias). A taxa de prenhez não diferiu ($P > 0,1$) entre os grupos controle, BE e E2+P4 no DG22 e no diagnóstico confirmatório em ambos experimentos. No Experimento 2, a perda gestacional entre o D22 e D37-67 foi similar ($P > 0,1$) sendo no controle (19% [36/185]), BE (15% [28/182]), e E2+P4 (15% 28/184)]. No D22, o FD foi maior ($P < 0,05$) no grupo controle ($11,9 \pm 0,14$), do que no BE ($11,3 \pm 0,1$) e E2+P4 ($11,5 \pm 0,1$). A proporção de novilhas

detectadas em estro no D24 não diferiu ($P > 0,1$) entre os grupos. Entretanto, a taxa de crescimento do FD (mm/dia) foi maior ($P < 0,05$) no grupo BE ($0,89 \pm 0,08$) do que no controle ($0,59 \pm 0,07$) e E2+P4 ($0,66 \pm 0,09$). A taxa de prenhez para a segunda IATF foi maior ($P < 0,05$) no grupo BE (47% [94/200]) quando comparado ao controle (37% [76/203]), mas não diferiu ($P > 0,1$) para o grupo E2+P4 (43% [93/214]). A prenhez acumulativa (primeira e segunda IATFs) não diferiu ($P > 0,1$) entre o controle (59% [204/344]), BE (65% [227/349]) e E2+P4 (64% [220/342]). Conclui-se que a administração de 1 mg de BE ou 1 mg de E2 + 9 mg de P4 aos 14 dias pós-IATF antecipa a luteólise nas novilhas NG mas não compromete a gestação. O tratamento com BE induz a emergência de uma nova onda folicular sincronizada e aumenta a taxa de prenhez nas novilhas NG ressinchronizadas.

Palavras-chave: Resinchronização. Ultrassonografia Doppler. Estradiol. Luteólise. Novilhas de corte.

ABSTRACT

MOTTA, I.G. **Impacts of estradiol use on super early resynchronization at 14 days post IATF in beef heifers.** [Impactos do uso do estradiol na ressincronização superprecoce aos 14 dias pós-IATF em novilhas de corte]. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The aim of this study was to evaluate the use estradiol benzoate (EB) or 17 β -estradiol (E2) associated with progesterone (P4) for resynchronization of ovulation at 14 days after timed artificial insemination (TAI) and its effect on the maintenance of pregnancy in beef heifers. In Experiment 1 (Exp1), Nelore heifers were submitted to TAI (D0). On D14, the animals received an intravaginal P4 device and were allocated in three groups: control (no treatment; n=17); EB (1mg EB; n=17); and E2+P4 (1mg E2 + 9mg P4; n=18). Ultrasonography evaluations (B mode and Doppler) were performed daily from D14 to D22 for follicular and luteal dynamics. On D22, the devices were removed and pregnancy diagnosis was performed with Doppler ultrasonography to for luteolysis detection. In Exp2, 1178 Nelore heifers and 117 cross beef heifers (Nelore x Angus) were resynchronized according to Exp1 and randomly allocated in the same three groups. On D22, the dominant follicle (DF) was measured in non-pregnant (NP) and the second TAI was performed on D24. In a subgroup of NP heifers (n=337), an oestrus detection patch was used between D22 and D24 and the DF was measured at D24. Confirmatory diagnoses were performed between D37-67 and D43-47 after first and second TAI, respectively. In Exp1, the proportion of heifers with a synchronized follicle wave emergence (from 3 to 5 days after treatment) was greater ($P<0.05$) in the EB group (93.8%) than in the control (62.5%) and E2+P4 (64.7%) groups. Luteolysis occurred earlier ($P<0.05$) in the EB (18.6 ± 0.5) and E2+P4 (19.1 ± 0.5) groups than in the controls (20.6 ± 0.4). The pregnancy rate after first TAI did not differ ($P>0.1$) among the control, EB and E2+P4 groups in DG22 and confirmatory diagnosis in both experiments. In Exp2, the pregnancy loss between D22 and D37-67 was similar ($P>0.1$) and in the control group (19% [36/185]), EB (15% [28/182]) and E2+P4 (15% [28/184]). The DF on D22 was greater ($P<0.05$) in the control group (11.9 ± 0.14) than in EB (11.3 ± 0.1) and E2+P4 (11.5 ± 0.1). No difference ($P>0.1$) was observed in the proportion of heifers detected in estrus on D24, but DF growth rate (mm/day) was

greater ($P < 0.05$) in the EB group (0.89 ± 0.08) than in the control (0.59 ± 0.07) and E2+P4 (0.66 ± 0.09) groups. The pregnancy rate for the second TAI was greater ($P < 0.05$) in the EB group (47% [94/200]) than in the control group (37% [76/203]), but did not differ ($P > 0.1$) from the E2+P4 group (43% [93/214]). Cumulative pregnancy (first and second TAIs) did not differ ($P > 0.1$) between control (59% [204/344]), EB (65% [227/349]) and E2+P4 (64% [220 / 342]). It is concluded that the administration of 1 mg EB or 1 mg E2 + 9 mg P4 at 14 days post-TAI anticipates luteolysis in NP heifers but does not compromise pregnancy. The treatment with EB induces a new synchronized follicle wave emergence and improves the pregnancy rate of resynchronized NP heifers.

Keywords: Resynchronization. Doppler ultrasonography. Estradiol. Luteolysis. Beef heifers.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 Bases fisiológicas da reprodução na fêmea bovina	17
	2.1.1 Ciclo estral.....	17
	2.1.2 Ovulação e formação do corpo lúteo.....	18
	2.2 Reconhecimento materno da gestação.....	19
	2.2.1 Ação do IFN- τ	19
	2.2.2 Luteólise.....	20
	2.3 Controle farmacológico do ciclo estral e sincronização da ovulação	21
	2.3.1 Desenvolvimento e utilização dos protocolos de sincronização da ovulação.....	21
	2.3.2 Protocolos à base de tratamentos com E2 e P4	23
	2.4 Ressincronização da ovulação	23
	2.5 Aplicação de estradiol no diestro	25
3	USO DO ESTRADIOL NA RESSINCRONIZAÇÃO AOS 14 DIAS APÓS A IATF EM NOVILHAS DE CORTE NÃO COMPROMETE A MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO E MELHORA A TAXA DE PREENHEZ NAS FÊMEAS RESSINCRONIZADAS	28
4	CONCLUSÕES	31
	REFERÊNCIAS	32
	APÊNDICE	42

1 INTRODUÇÃO

Em 2017, o rebanho brasileiro de bovinos atingiu o recorde efetivo alcançando aproximadamente 214,89 milhões de cabeças (IBGE). O Brasil é destaque na produção de bovinos, possui o maior rebanho comercial do mundo além de possuir importante papel na produção mundial de carne e de leite, sendo o maior exportador de carne bovina (ABIEC, 2019). Para que se tenha um aumento da produtividade nesse setor, é necessário que os sistemas pecuários sejam cada dia mais eficientes em todos os setores de produção, principalmente no que tange a eficiência reprodutiva para se obter um maior número de bezerros nascidos.

Alternativas para melhorar a eficiência reprodutiva consistem em: reduzir o período entre parto/concepção, identificar uma possível morte embrionária precoce, que ocorre em 40% dos casos entre os dias 8 e 17 de gestação (THATCHER et al., 2001), bem como detectar as fêmeas não gestantes o mais rápido, possibilitando a estas uma nova chance de concepção.

Em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), uma alternativa para aumentar a eficiência reprodutiva com o uso de sêmen de touros de elevado material genético é a ressincronização da ovulação. Esta técnica consiste na sincronização da ovulação de uma fêmea que foi previamente inseminada em tempo fixo. Tal estratégia é de extrema importância, uma vez maximiza as vantagens da IATF, possibilitando um aumento do número de bezerros nascidos de inseminação artificial, sem a necessidade da observação de cio (BÓ et al., 2016; BARUSELLI et al., 2017). Além disso, consegue-se reduzir o número de touros na propriedade e melhorar o controle das concepções e partições (STEVENSON et al., 2003). Uma outra vantagem da ressincronização é a possibilidade de aumentar a taxa de prenhez final em comparação ao sistema de uma IATF mais repasse com touro devido a possibilidade de retorno da condição de anestro em parte da vacas paridas (CREPALDI et al., 2017).

Dentre as possibilidades da utilização desta técnica, a ressincronização convencional inicia-se apenas nas fêmeas diagnosticadas como não gestantes por meio da ultrassonografia transretal em torno dos 30 dias após a IATF. Alternativamente, é possível antecipar a ressincronização, iniciando-se o protocolo hormonal aos 22 dias após a primeira IATF, em todos os animais, sem saber a

condição gestacional em que se encontram. Assim, realiza-se o diagnóstico de gestação aos 30 dias e nas fêmeas não gestantes, continua-se a ressincronização com aplicação o agente luteolítico e o indutor da ovulação (SÁ FILHO et al., 2014).

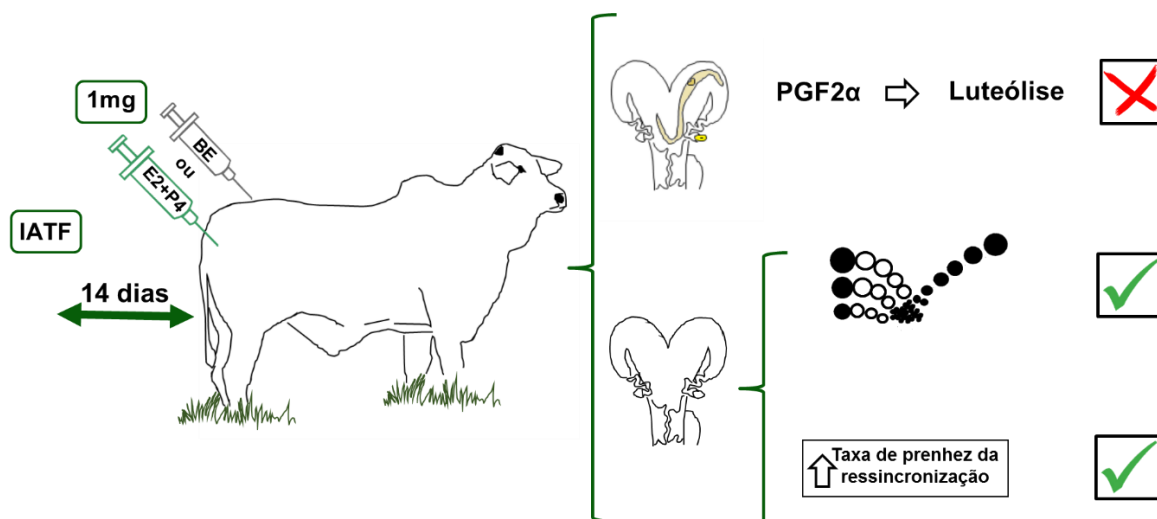
Com o advento de métodos inovadores para o diagnóstico gestacional superprecoce aos 20-22 dias por meio da ultrassonografia Doppler (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014), atualmente é possível a realização de uma ressincronização superprecoce ao redor de 12-14 dias após a primeira IATF. A ultrassonografia Doppler permite a detecção da luteólise nas fêmeas não gestantes com alta acurácia (90 a 95%) e possibilita que estes animais sejam submetidos a uma nova IATF em um intervalo de 24 dias após a primeira (PUGLIESI et al., 2017). Consegue-se assim, reduzir em 16 dias o intervalo entre inseminações, quando comparada a ressincronização convencional, ou reduzir em 8 dias, quando todos os animais são ressincronizados 22 dias após a IATF, possibilitando um aumento na taxa de serviço, bem como, a realização de três IATFs em um intervalo de 48 dias (BARUSELLI et al., 2017).

Apesar destes benefícios, a ressincronização quando iniciada 14 dias após a primeira IATF coincide com o período de reconhecimento materno da gestação. Em bovinos, o reconhecimento ocorre por meio de uma glicoproteína denominada de interferon-tau (IFN- τ), que é secretada pelo concepto durante seu alongamento no ambiente uterino, e inibe a expressão dos receptores de estrógeno (ESR) e de ocitocina (OXTR) no epitélio luminal do endométrio, evitando assim, a liberação pulsátil de prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2 α}) (SPENCER e BAZER, 1996). A administração de 17 β estradiol (E2) neste período de reconhecimento materno da gestação é controverso, uma vez que estudos anteriores relataram que a aplicação de benzoato de E2 (BE) aos 13 dias após a inseminação, causou a luteólise (VIEIRA et al., 2014) prejudicando conseqüentemente a manutenção da gestação (CUTAIA et al., 2002; VIEIRA et al., 2014). Entretanto, El-Zarkouny and Stevenson (2004) ao utilizarem 1 mg de BE aos 13 e 21 dias após a primeira IATF, em vacas holandesas lactantes e Colazo et al. (2006) ao administrarem 1,5 mg de E2 mais 50 mg de P4 injetável diluída em óleo de canola no dia 13, associado a um implante intravaginal de P4 em novilhas de corte taurinas, não observaram efeito negativo destes tratamentos nas taxa de prenhez quando comparado aos grupos que não receberam o tratamento. Frente aos possíveis efeitos negativos do E2 na manutenção da gestação, Baruselli et al. (2017) sugeriram substituir a aplicação do BE pela P4 injetável de curta ação,

na dose de 100 mg. Penteado et al. (2016) e Pugliesi et al. (2019) ao realizarem esta substituição, observaram 51-61% de taxa de prenhez na ressincronização superprecoce, totalizando 75-76% de prenhez acumulativa da primeira e segunda IATF. Apesar da P4 injetável ser eficiente nestes protocolos de ressincronização, o uso do E2 em doses reduzidas pode ser uma alternativa para a ressincronização superprecoce em novilhas, uma vez que pode melhorar a emergência folicular e não necessariamente induzir a luteólise nas fêmeas que ficaram gestantes à primeira IATF.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar (1) a utilização de 1 mg de BE ou 1 mg de E2 associado a 9 mg de P4 na ressincronização superprecoce aos 14 dias após a IATF em novilhas de corte, (2) se estes causariam luteólise e perda gestacional nas fêmeas que ficaram gestantes à primeira IATF e (3) a taxa de prenhez da ressincronização. Para isso, estabeleceram-se como hipóteses que o uso de E2 ou BE em baixas doses (1mg) aos 14 dias pós-IATF: 1) não induz a luteólise nas fêmeas gestantes à primeira IATF e conseqüentemente não compromete a manutenção da gestação; 2) causa emergência sincronizada de uma nova onda folicular; e 3) resulta em maior taxa de prenhez nas novilhas inseminadas após a ressincronização (Figura 1).

Figura 1- Modelo Hipotético Gráfico



Fonte: (MOTTA, I. G.,2019.)

A aplicação adicional de 1mg de BE ou 1mg de E2 associado à 9 mg de P4, juntamente com um dispositivo intravaginal de P4 (1g) no dia 14 após a inseminação em novilhas de corte, não induzirá a luteólise e consequentemente não prejudicará a manutenção da gestação. Além disso, a aplicação de E2 e BE irá causar a emergência de uma nova onda folicular sincronizada, bem como aumentar a taxa de prenhez nas novilhas submetidas a ressincronização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BASES FISIOLÓGICAS DA REPRODUÇÃO NA FÊMEA BOVINA

2.1.1 Ciclo estral

As fêmeas bovinas são poliéstricas não sazonais, apresentam estro em um intervalo médio de 21 dias, podendo variar entre 18 e 24 dias (FORDE et al., 2011). O ciclo estral é caracterizado pelo crescimento e regressão de folículos e corpo lúteo (SARTORI e BARROS, 2011). É regulado por hormônios oriundos principalmente do hipotálamo (hormônio liberador de gonodotrofinas; GnRH), da hipófise anterior (hormônio folículo estimulante; FSH e hormônio luteinizante; LH) do ovário (P4; E2 e inibinina) e pelo útero (PGF_{2α}) (FORDE et al., 2011). Na fêmea bovina o ciclo estral é composto por quatro estágios: proestro, estro, metaestro e diestro (MACMILLAN e BURKE, 1996), as quais podem ser dispostas em duas grandes fases: 1) folicular ou estrogênica que predomina o E2 e abrange o crescimento folicular até a ovulação (pró-estro e estro) e 2) luteínica ou progesterônica em que o hormônio predominante é a P4 e compreende o período da formação do corpo lúteo até a luteólise (metaestro e diestro) (MACMILLAN e BURKE, 1996; FORDE et al., 2011).

Nesta mesma espécie, o crescimento folicular ocorre em um padrão de ondas (GINTHER et al., 2003) na qual, cada uma delas é dividida em quatro fases: emergência, desvio, dominância e atresia ou ovulação do folículo dominante (GINTHER et al., 1997). A emergência de uma nova onda folicular é caracterizada por um crescimento de um *pool* de folículos, decorrente de um aumento transitório nas concentrações plasmáticas de FSH (ADAMS et al., 1992). O FSH se liga aos seus receptores que estão localizados nas células da granulosa (RICHARDS et al., 1998) e provoca um aumento da atividade da enzima aromatase (P450arom e CYP19), que convertem andrógenos em estrógenos (HILLIER, 1994), fazendo com que ocorra um aumento na taxa de crescimento folicular. Sendo assim, ocorre um aumento na produção de E2 e inibina, que por sua vez sinalizam à hipófise (“*feedback*” negativo) para que ocorra a redução da liberação de FSH (SUNDERLAND et al., 1994; GINTHER et al., 2000). A queda do FSH circulante faz com que, folículos dependentes a esta gonadotrofina entrem em atresia. No entanto, o folículo dominante passa ter

uma maior dependência e responsividade ao LH e continua assim o seu desenvolvimento (GINTHER et al., 2000). Após o desvio e dominância, este folículo passa a ter receptores de LH não só nas células da teca como também nas células da granulosa, o que possibilita a continuação do crescimento, produção de E2 e ovulação (ZELEZNIK, 2004). Contudo, a ovulação só ocorrerá espontaneamente se a fêmea não estiver gestante, uma vez que a P4 faz feedback negativo em LH (SENGER, 2003). Portanto, após a luteólise e queda nas concentrações de P4, o E2 desencadeará a liberação de GnRH que resultará em um pico de LH, causando a maturação e ovulação do folículo dominante (FORTUNE, 1994).

Em relação à dinâmica folicular, algumas diferenças são observadas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma particularidade é o número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral, em que fêmeas da raça Holandesa apresentam uma maior incidência de duas e três ondas (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988), enquanto que fêmeas zebuínas apresentam três ou quatro, sendo mais frequente a ocorrência de três ondas (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000).

Além disso, fêmeas *Bos indicus* apresentam normalmente um curto período de estro, com uma alta incidência de estros noturnos o que dificulta a sua detecção (PINHEIRO et al., 1998). Wiltbank et al. (2006) relataram uma relação negativa entre a produção leiteira e a duração do estro em vacas Holandesas (*Bos taurus*), decorrente da menor concentração circulante de E2 devido ao aumento da metabolização hepática deste esteroide.

2.1.2 Ovulação e formação do corpo lúteo

O folículo dominante torna-se ovulatório apenas na última onda de crescimento folicular. Uma vez que nas ondas anteriores, a presença de um corpo lúteo ativo, secretando altas concentrações de P4, provoca um “*feedback*” negativo no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que por sua vez bloqueia o pico de LH, fazendo com que os folículos dominantes entrem em atresia (GINTHER et al., 1996). Entretanto, quando se tem baixa concentração de P4, ocorre uma maior pulsatilidade de LH e conseqüente aumento do E2, que por “*feedback*” positivo estimula a secreção do GnRH e conseqüentemente pico de LH, resultando em maturação folicular e ovulação (FORTUNE, 1994).

Após a ovulação, inicia-se o desenvolvimento do corpo lúteo a partir do crescimento, diferenciação, reorganização e luteinização das células da teca e da granulosa remanescentes do folículo ovulatório (BERTAN et al., 2006). As células da teca e da granulosa dão origem respectivamente às células luteais pequenas e grandes, as quais são as principais responsáveis pela síntese de P4 (THATCHER, 2017).

O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória responsável não só pela produção de P4, que é indispensável para o estabelecimento e manutenção da gestação, como também para regulação da ciclicidade e fertilidade (SKARZYNSKI et al., 2013). Em bovinos é detectado em 3 a 4 dias após a ovulação, e o LH é o principal estimulador da esteroidogênese (MCCRACKEN et al., 1999). Além do LH, outros hormônios participam do desenvolvimento funcional e estrutural do corpo lúteo, como: ocitocina, prostaglandinas, e fatores de crescimento (MIYAMOTO et al., 2009).

2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

2.2.1 Ação do IFN- τ

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o processo fisiológico pelo qual o conceito bloqueia a ocorrência da luteólise (ANTONIAZZI et al., 2011). Em geral, nos mamíferos, para que se tenha o estabelecimento e manutenção da gestação é essencial uma comunicação entre o desenvolvimento do conceito e o endométrio materno (SÁNCHEZ et al., 2018). Em ruminantes, durante o período de pré-implantação, o blastocisto eclodido sofre alterações morfológicas significativas, passando sequencialmente de uma estrutura esférica para ovóide (FLÉCHON et al., 2007) e começa a se alongar em uma forma filamentosa no dia 12 (ovinos) ou 15 (bovinos) após a fertilização, que eventualmente, ocupa todo o comprimento do corpo uterino (THOMAS et al., 2017). O alongamento do conceito é fundamental para a produção de IFN- τ , reconhecimento materno da gestação e implantação (FARIN et al., 1989; GUILLMOT et al., 1990; GRAY et al., 2002).

O IFN- τ é uma glicoproteína secretada em grandes quantidades pelas células mononucleares do trofotoderma do conceito de ruminantes, antes do período de implantação (FARIN et al., 1989; BAZER et al., 2012) que age no útero, de forma parácrina inibindo a expressão de ESR1 e de OXTR no epitélio luminal do endométrio,

bloqueando a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SPENCER e BAZER, 1996). É classificado como interferon do tipo I e sua principal função é bloquear a ocorrência da luteólise e consequentemente o retorno à ciclicidade, possibilitando que o corpo lúteo permaneça secretando concentrações adequadas de P4 durante o período gestacional (NISWENDER et al., 2000; ROBERTS et al., 2008).

A P4 é responsável por estimular secreções endometriais (histotrofo), as quais são essenciais para o desenvolvimento do embrião e manutenção da gestação durante o período pré-implantação (GEISERT et al., 1992). Animais com altas concentrações de P4 na circulação durante o período de reconhecimento materno da gestação tiveram conceptos mais desenvolvidos e uma maior concentração de $\text{IFN-}\tau$ (CLEMENTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016). Já conceptos pouco desenvolvidos secretam uma menor quantidade de $\text{IFN-}\tau$, sendo insuficiente para causar o bloqueio da luteólise, culminando consequentemente em perdas embrionárias (MANN e LAMMING, 1999).

2.2.2 Luteólise

Durante o período de luteólise o tecido luteal sofre mudanças quanto a esteroidogênese, vascularização e remodelamento, culminando em uma substituição da glândula por tecido conjuntivo (STOCCO et al., 2007). Este período compreende a luteólise funcional, a qual é representada por uma drástica queda na secreção de P4, e pela luteólise estrutural que representa a apoptose celular do corpo lúteo e formação do corpo *albicans* (STOCCO et al., 2007; THATCHER, 2017).

A ausência de um embrião no final do diestro, por volta do 16º ao 18º dia do ciclo estral, faz “downregulation” nos receptores de P4, provocando o retorno da ação estrogênica no hipotálamo e endométrio, que leva a um aumento na expressão de receptores de estradiol (ESR) no útero. O aumento do E2 provoca um aumento na expressão dos receptores de ocitocina (OTR). A ocitocina, a qual é secretada primeiramente pela hipófise posterior e posteriormente pelo corpo lúteo, se liga aos seus receptores e desencadeia a síntese e a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que é responsável pelo início da luteólise (SPENCER e BAZER, 1996; THATCHER, 2017). A secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser mensurada pela dosagem do metabólito da PGF (13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$; PGFM) (GINTHER et al., 2007), uma vez que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem meia vida

plasmática curta, aproximadamente um minuto enquanto que PGFM possui uma meia vida em torno de oito minutos.

O E2 participa da ocorrência da luteólise por duas maneiras: por meio de um estímulo no hipotálamo, que promove um aumento na frequência de pulsos de ocitocina e por estímulos endometriais que culminam em um aumento na expressão de receptores de ocitocina no útero (MCCRACKEN et al., 1999). Araujo et al. (2009) relataram que novilhas submetidas a ablação folicular tiveram uma redução nas concentrações circulantes de E2 e apresentaram um retardo na ocorrência da luteólise. Por outro lado, a aplicação de 1mg de E2 nos animais que foram submetidos a ablação folicular, causou um aumento na secreção de PGF_{2α} e eliminou o atraso da luteólise.

Pugliesi et al. (2011) ao aplicarem diferentes doses (0,01, 0,05 ou 0,1mg) de E2 14 dias após a ovulação em novilhas Holandesas não inseminadas, observaram que a dose de 0,05mg foi suficiente em estimular pulsos proeminentes de PGFM e induzir a luteólise. Estes resultados evidenciam o papel do E2 na cascata luteolítica mesmo em baixas concentrações. No entanto, para que ocorra um aumento de PGFM em resposta ao E2 é necessário um período de pré-exposição à P4 por pelo menos 10 dias (GINTHER et al., 2010; MCCRACKEN et al., 1999).

2.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

2.3.1 Desenvolvimento e utilização dos protocolos de sincronização da ovulação

O uso das biotécnicas reprodutivas são de extrema importância para o aumento da eficiência reprodutiva impactando diretamente na cadeia produtiva da carne e do leite. A inseminação artificial possibilita um incremento genético nas propriedades além de controlar as doenças venéreas (BARUSELLI et al., 2018). No entanto, a observação de cio é laboriosa, demanda tempo e não é eficaz, fazendo com que a técnica seja pouco usual (COLAZO e MAPLETOFT, 2014), principalmente quando se trabalha com fêmeas *Bos indicus*, uma vez que apresentam estro de menor duração quando comparado às fêmeas *Bos taurus* e predominantemente noturno (PINHEIRO et al., 1998).

Frente a estes problemas, protocolos hormonais foram desenvolvidos possibilitando que as inseminações fossem realizadas em tempo fixo sem a necessidade da observação de cio (BARUSELLI et al., 2017). Tais protocolos consistem em: causar a emergência de uma nova onda folicular; controlar o crescimento do folículo (fase progesterônica); encerrar a fase progesterônica e induzir a ovulação em todos os animais (BARUSELLI et al., 2006).

A emergência de uma nova onda folicular pode ser induzida mecanicamente por meio da ablação folicular (BERGFELT et al., 1997) ou por tratamentos que consistem em: 1) induzir a ovulação (GnRH, LH; gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou 2) causar a atresia folicular (associação de E2 com P4) (COLAZO e MAPLETOFT, 2014). A preferência por um ou outro depende da disponibilidade e da eficácia dos hormônios em um determinado país; por exemplo, protocolos baseados em E2 são usados em rebanhos na América do Sul e na Austrália, enquanto protocolos baseados em GnRH tendem a ser usados mais na América do Norte, Europa e Nova Zelândia, onde o uso de E2 comercialmente é proibido (BÓ et al., 2016).

Um dos primeiros protocolos de IATF (Ovsynch) desenvolvidos consiste em duas aplicações de GnRH intercaladas com uma dose de PGF_{2α} (GnRH-7 dias-PGF-48h-GnRH-16h-IATF) (PURSLEY et al., 1995). A primeira aplicação de GnRH tem a função de induzir a secreção de LH, resultando em ovulação ou luteinização do folículo dominante e a emergência de uma nova onda folicular em 2 dias, já a aplicação de PGF_{2α} após sete dias causa a luteólise enquanto que a segunda administração de GnRH induz a secreção de LH para sincronizar a ovulação do novo folículo dominante (BÓ et al., 2002). No entanto, fêmeas *Bos indicus* apresentam respostas reduzidas a este protocolo quando comparado as fêmeas *Bos taurus* (BARROS et al., 2000; BARUSELLI et al., 2012). Além disso, animais zebuínos em condições tropicais apresentaram uma menor taxa de prenhez ao protocolo Ovsynch, quando comparado a protocolos à base de P4 e E2 (BARUSELLI et al., 2004).

A baixa resposta das fêmeas zebuínas a estes protocolos, pode ser decorrente da alta incidência de anestro (pós parto) que culmina na presença de folículos não responsivos à primeira aplicação de GnRH, resultando em uma baixa eficiência na indução da ovulação (WILTBANK et al., 2002).

2.3.2 Protocolos à base de tratamentos com E2 e P4

A associação de P4 com BE é a base para o início de um dos protocolos mais populares para realização da IATF em bovinos de corte e de leite (BÓ et al., 2002) e tem como objetivo inicial causar a atresia folicular. O protocolo consiste na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 associado a uma dose de 2 mg de BE em vacas e novilhas (BÓ et al., 2002) ou 1 mg para novilhas (MARTÍNEZ et al., 2005). O dispositivo permanece por 7-9 dias e no momento da retirada aplica-se um agente luteolítico para garantir a queda nas concentrações de P4 (exógena e endógena), além do agente luteolítico aplica-se também um indutor da ovulação (BARUSELLI et al., 2018). A aplicação do BE pode ser substituída pela administração de E2 (COLAZO e MAPLETOFT, 2014). Bó et al. (2000) relataram que a aplicação de 1 mg de E2 foi tão eficaz quanto a dose de 5mg de E2 para causar a emergência de uma nova onda folicular em novilhas de corte taurinas.

Independentemente do tipo de E2, esta associação com a P4 causa a supressão na secreção de FSH e LH causando a atresia do folículo dominante e indução da emergência de uma nova onda de crescimento folicular 3 a 4 dias após sua aplicação (COLAZO e MAPLETOFT, 2014). Após 7 a 9 dias, ou seja, no dia da retirada do dispositivo, continua-se o protocolo, aplicando o agente luteolítico e o indutor da ovulação. Para induzir o pico de LH e a ovulação, uma dose baixa (1mg) de BE é aplicada 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 para que a IATF seja realizada 30 a 34 horas depois (MARTÍNEZ et al., 2005). Alternativamente, pode-se aplicar 0,5 a 1 mg de cipionato de E2 no momento da retirada do dispositivo e realizar a IATF em um intervalo de 48 a 56 horas (COLAZO et al., 2003). Independente do éster (BE ou Cipionato de E2), ambos induziram o pico de LH, ovulação e resultaram em taxas de prenhez semelhantes quando foram aplicados em vacas *Bos indicus* lactantes (SALES et al., 2012). No entanto, a utilização do cipionato de E2 como indutor da ovulação possibilita a redução de um manejo e não afeta a fertilidade (BARUSELLI et al., 2017).

2.4 RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

A ressinchronização consiste em sincronizar a emergência de uma nova onda folicular, bem como a ovulação das fêmeas que foram expostas à uma IATF, mas que

não conceberam (BARUSELLI et al., 2017). Dentre as vantagens, é possível aumentar o número de bezerros nascidos por inseminação, eliminar a observação de cio, reduzir a quantidade de touros para o repasse e por consequência controlar os períodos de concepção e parição (STEVENSON et al., 2003).

A ressincronização convencional inicia-se após o diagnóstico de gestação, o qual é realizado por volta do dia 30 após a IATF e as fêmeas não gestantes recebem o mesmo protocolo hormonal para que possam ser novamente inseminadas em tempo fixo (STEVENSON et al., 2003; MARQUES et al., 2015). Neste âmbito, utiliza-se uma menor quantidade de hormônios, além de haver uma flexibilidade quanto ao dias de manejo, entretanto, as inseminações são realizadas com um intervalo aproximado de 40 dias, o que é longo, uma vez que as fêmeas não gestantes estariam retornando em cio por volta de 21 dias (BARUSELLI et al., 2017).

Alternativamente, novas estratégias de ressincronização vêm sendo estudadas para que os protocolos se iniciem antes do diagnóstico gestacional, com o objetivo de diminuir o intervalo entre as inseminações. Sendo assim, inicia-se o protocolo em todas as fêmeas aproximadamente 22 dias após a IATF, sem saber o *status* gestacional que estas se encontram (STEVENSON et al., 2003; CAMPOS et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2019). No dia do diagnóstico, o qual coincide com a retirada do dispositivo de P4, as fêmeas diagnosticadas como gestantes são excluídas dos tratamentos subsequentes, continuando o protocolo de ressincronização apenas nas fêmeas não gestantes (BÓ et al., 2016; BARUSELLI et al., 2018).

Sá Filho et al. (2014) compararam a aplicação de 1 mg de BE vs. 100µg de GnRH na ressincronização aos 22 dias após a IATF em novilhas Nelore e observaram que as taxas de prenhez referente à primeira inseminação não diferiram (41,5% e 41,9%, respectivamente) e que o BE melhorou a taxa de prenhez da ressincronização (49,2 vs. 37,2%). Pessoa et al. (2015) testaram as doses de 1 ou 2 mg de BE, 22 dias após a IATF prévia e observaram que independentemente da dose, a aplicação de BE não induziu a luteólise, já que as perdas embrionárias referentes à inseminação anterior foram semelhantes (3,8% e 5,5%, respectivamente), porém a dose de 2mg culminou em uma maior taxa de concepção à ressincronização (47,3% vs. 36,1%). Sendo assim, esta ressincronização além de dispensar à detecção de estro para execução do segundo serviço, possibilita a realização de duas inseminações em um menor intervalo (CHEBEL et al., 2003), no entanto, utiliza-se uma maior quantidade

de hormônios e o dia do diagnóstico gestacional deixa de ser flexível, uma vez que o protocolo já se iniciou (BARUSELLI et al., 2018).

A ultrassonografia color Doppler vem sendo relatada como uma boa estratégia para diagnosticar as fêmeas não gestantes entre os dias 20 e 22 após a inseminação por meio da detecção da luteólise (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014). Frente a isso, um novo protocolo de ressincronização foi desenvolvido objetivando reduzir o intervalo entre as inseminações e consequentemente a duração da estação reprodutiva (PUGLIESI et al., 2019). O protocolo é iniciado em todas as fêmeas, 12 a 14 dias após a IATF para que a segunda IATF seja realizada em um intervalo de 22 a 24, possibilitando a realização de três IATFs em um intervalo máximo de 48 dias (BARUSELLI et al., 2017). Entretanto, sabendo que o E2 participa da cascata luteolítica (MCCRACKEN et al., 1999; ARAUJO et al., 2009) e que o início do protocolo condiz com o período de reconhecimento materno da gestação, sua aplicação poderia comprometer as fêmeas que ficaram gestantes à primeira IATF. Estudos anteriores demonstraram que quando o E2 ou BE foi aplicado 12 a 13 dias após a IATF, estes induziram a luteólise culminando em uma menor taxa de concepção à primeira IATF (CUTAIA et al., 2002; MACHADO et al., 2008; VIEIRA et al., 2014).

Perante a este risco, uma opção seria substituir o E2 pela administração de P4 injetável em alta dosagem, para causar a emergência de uma nova onda folicular (CAVALIERI, 2018). Desta forma, Penteado et al. (2016) compararam dois programas de ressincronização, iniciando o protocolo no dia 14 (dispositivo de P4 associado a 100 mg de P4 injetável de curta ação) e no dia 22 (2 mg de BE associado a um dispositivo de P4) após a IATF e não observaram diferença na taxa de prenhez após a primeira inseminação (53% vs. 48%), na ressincronização (51% vs. 56%), bem como, na prenhez acumulativa (75% [89/118] vs. 77% [97/126]). Alternativamente, mas com a mesma finalidade, a P4 de longa ação foi testada na ressincronização aos 12 dias após a IATF em vacas Nelore lactantes (PUGLIESI et al., 2019). Neste estudo, os animais que receberam além do dispositivo intravaginal de P4, uma aplicação adicional de 75mg de P4 de longa-ação, tiveram uma maior taxa de prenhez na ressincronização quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas um dispositivo intravaginal de P4 (60,9% [39/64] vs. 44,6% [25/56]).

2.5 APLICAÇÃO DE ESTRADIOL NO DIESTRO

O E2 é um hormônio esteroide sintetizado a partir do colesterol e é responsável por diversas funções na atividade reprodutiva das fêmeas mamíferas (SENGER, 2003). Basicamente o E2 tem a função de induzir o comportamento de cio, bem como, estimular o pico de GnRH quando a P4 circulante se encontra em baixas concentrações no período que antecede a ovulação (FORDE et al., 2011; SARTORI e BARROS, 2011). Além disso, sabe-se que o E2 tem papel importante na indução da luteólise (ARAUJO et al., 2009), mas há dúvidas sobre sua ação na atividade do corpo lúteo e, conseqüentemente, manutenção da prenhez.

O E2 administrado após 12 dias da ovulação em fêmeas não gestantes desencadeia um aumento nas concentrações de PGFM, seguidos por uma redução na concentração circulante de P4. Nestas condições, a administração de E2 na dose de 3mg, na veia jugular, no dia 13 do ciclo estral em novilhas Holandesas induziu a secreção de PGFM e desencadeou a luteólise (THATCHER et al., 1986). A aplicação de 1 mg de BE no dia 13 do ciclo estral em vacas Holandesas não lactantes comprometeu o desenvolvimento, a função luteal, e o diâmetro do corpo lúteo, que foi menor entre os dias 18 e 21 (BURKE et al., 2000). Ginther et al. (2010) ao aplicarem 0,1 mg de E2 nos dias 10, 12 e 14 após a ovulação em novilhas Holandesas não inseminadas, observaram um aumento nas concentrações de PGFM nos dias 12 e 14, mas não quando a aplicação foi realizada no dia 10, indicando que o útero precisa de um período mínimo de exposição a P4 para ser responsivo ao E2. Pugliesi et al. (2011) compararam diferentes doses de E2, consideradas fisiológicas para o período de pro-estro/estro, administradas no dia 14 após a ovulação e concluíram que o mecanismo endometrial da síntese de $PGF_{2\alpha}$ é dose dependente, uma vez que, a dose de 0,01mg foi ineficaz em aumentar a concentração de PGFM, entretanto, a dose de 0,05 e 0,1 mg foram eficazes, sendo a dose de 0,1 mg a mais eficiente entre elas.

Já quando o E2 ou o BE foram aplicados no período que antecede o reconhecimento materno da gestação em fêmeas inseminadas os resultados foram contraditórios. Alguns autores relataram que a aplicação do E2 na fase de diestro, induziu a luteólise (VIEIRA et al., 2014) e conseqüentemente a manutenção da gestação nas fêmeas que ficaram gestantes à primeira inseminação (CUTAIA et al., 2002; MACHADO et al., 2008; VIEIRA et al., 2014).

Cutaia et al. (2002) ao aplicarem 1 mg de BE no dia 13 após a IATF em vacas e novilhas de corte taurinas, observaram que em vacas a taxa de prenhez à primeira

inseminação não diferiu entre as fêmeas que receberam o BE e o grupo controle (43,9% [40/91] vs. 38,3% [36/94], respectivamente), entretanto, as novilhas do grupo tratado tiveram uma menor taxa de prenhez à primeira inseminação (41,6% [20/48] vs. 61,2% [30/49]). Machado et al. (2008) observaram que a aplicação de 5mg de E2 no dia 12 após a IATF, em vacas Nelore não lactantes, reduziu drasticamente a taxa de prenhez à primeira IATF quando comparado ao grupo controle (5,4% [3/55] vs. 34,5% [19/55]). Este efeito negativo também foi visto na prenhez acumulada após a realização de duas inseminações convencionais após a observação de cio (67,3% [37/55] vs. 81,8% [45/55]). Vieira et al. (2014) ao aplicarem 1,5 mg de BE em vacas holandesas lactantes, também no dia 13, observaram que o tratamento causou uma redução na perfusão sanguínea do corpo lúteo, seguido por uma menor taxa de concepção (14,9% [13/87] vs. 32,6% [28/86]).

Por outro lado, a aplicação de 1 mg de BE nos dias 12, 13 e 14 após a inseminação em vacas Holandesas lactantes não comprometeu as fêmeas que ficaram gestantes à primeira inseminação uma vez que a taxa de prenhez à primeira inseminação não diferiu para o grupo controle (60,9% [209/343] vs. 58,8% [208/354], respectivamente) (MACMILLAN et al., 1997). Resultados semelhantes foram posteriormente obtidos por Stevenson et al. (2003) quando aplicaram 1mg de BE ou 0,5mg de cipionato de E2 no dia 13 após a inseminação em vacas de corte taurinas lactantes e observaram que a taxa de concepção à primeira inseminação não diferiu quando comparado ao controle sendo 44,4% [68/153] para o BE; 51,7% [77/149] para o cipionato de E2 e 51,8% [159/307] para o controle. El-Zarkouny e Stevenson (2004) também não observaram comprometimento da gestação após a administração de 1mg de BE ou 1mg de cipionato de E2 em vacas holandesas lactantes no dia 13 após a primeira IATF em relação ao controle (42% [20/47]; 38% [18/48] e 42% [20/47] respectivamente). Semelhantemente, a aplicação de 1,5 mg de E2 associado à 50 mg de P4 injetável no dia 13 após a IATF em novilhas de corte taurinas não causou efeito negativo nas taxas de prenhez à primeira inseminação quando comparado ao controle (49,5% [46 /93] vs. 47,3% [44/93]) (COLAZO et al., 2006). Leyva et al. (2016) ao aplicarem 1 mg de cipionato de E2, 13 dias após a inseminação artificial em vacas Holandesas repetidoras de cio, relataram que o estrógeno não afetou a prenhez do primeiro serviço quando comparado ao controle (23,6% [13/55] vs. 20% [11/55], respectivamente) e aumentou a taxa de prenhez nas fêmeas que retornaram ao cio (50% [21/42] vs. 18% [8/44]).

3 USO DO ESTRADIOL NA RESSINCRONIZAÇÃO AOS 14 DIAS APÓS A IATF EM NOVILHAS DE CORTE NÃO COMPROMETE A MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO E MELHORA A TAXA DE PREENHEZ NAS FÊMEAS RESSINCRONIZADAS.

O presente capítulo aborda resumidamente os dados apresentados no artigo intitulado **“Safe use and improved pregnancy outcomes for beef heifers resynchronized at 14 days after TAI using estradiol”** submetido para a revista *Theriogenology*. Os dados na íntegra estão disponíveis no Apêndice A desta dissertação.

Com o advento da ultrassonografia Doppler é possível diagnosticar com alta acurácia as fêmeas não gestantes, por volta do dia 20 a 22 após a IATF (Siqueira et al., 2013; Pugliesi et al., 2014). Sendo assim, é possível iniciar um protocolo de ressincronização superprecoce por volta do dia 12 e 14 após a IATF, o que possibilita a realização de uma segunda IATF em um menor intervalo de tempo (22 a 24 dias) (PENTADO et al., 2016; PUGLIESI et al., 2019). No entanto, a aplicação de E2 e seus ésteres neste período é controversa. Alguns autores relataram um comprometimento da funcionalidade do corpo lúteo (VIEIRA et al., 2014) e uma menor taxa de prenhez à primeira IATF (CUTAIA et al., 2000; MACHADO et al., 2008; VIEIRA et al., 2014). Enquanto que, outros autores não observaram diferença na taxa de prenhez à primeira IATF entre os animais tratados ou não com o E2 (STEVENSON et al., 2003; EL-ZARKOUNY E STEVENSON, 2004; COLAZO et al., 2006). Sendo assim é necessário um melhor entendimento dos efeitos da aplicação de E2 e seus ésteres neste período.

Para isso, novilhas Nelore (Experimento 1) foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação à base de E2/P4, sendo a IATF no D0. No D14 os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 e foram divididos aleatoriamente em três

grupos experimentais: controle (sem tratamento adicional, n=17), BE (1mg, n=17) e E2+P4 (1mg de E2 associado a 9 mg de P4, n=18). Avaliações ultrassonográficas (modo B e Doppler) foram realizadas diariamente do D14 ao D22 para realização da dinâmica folicular e luteal, juntamente com colheitas de sangue para dosagem de P4. O diagnóstico gestacional foi realizado no D22 por meio da detecção da luteólise com a ultrassonografia Doppler e as fêmeas não gestantes receberam a aplicação do agente luteolítico e o indutor da ovulação, enquanto as demais tiveram apenas o dispositivo intravaginal de P4 removido e foram submetidas ao diagnóstico gestacional confirmatório no D28. No Experimento 2, novilhas Nelore (n=1178) e novilhas cruzadas (Nelore x Angus, n= 117) foram resincronizadas conforme o Experimento 1 e 14 dias após a IATF foram divididas nos mesmos grupos experimentais controle (n=433), BE (n=431) e E2+P4 (n=431). No entanto, nesse experimento os animais não foram submetidos as avaliações ultrassonográficas diárias. No D22, além do diagnóstico gestacional, o folículo dominante foi mensurado nas fêmeas não gestantes e uma segunda IATF foi realizada no D24. Em um subgrupo de novilhas não gestantes (n=337), um adesivo para detecção de cio foi usado entre D22 e D24 e o folículo dominante foi também mensurado no D24. Os diagnósticos de gestação foram realizados entre D37-67 e 43-47 após a primeira e segunda IATF, respectivamente. No Experimento 1, a proporção de novilhas com emergência folicular sincronizada (3 a 5 dias após o tratamento) foi maior ($P<0,05$) no grupo BE (93,8%) quando comparado ao controle (62,5%) e E2+P4 (64,7%). O dia da luteólise foi antecipado ($P<0,05$) nos grupos BE ($18,6\pm 0,5$ dias) e E2+P4 ($19,1\pm 0,5$ dias) quando comparado ao controle ($20,6\pm 0,4$ dias). A taxa de prenhez não diferiu ($P>0,1$) entre os grupos controle, BE e E2+P4 no DG22 e no diagnóstico de gestação em ambos experimentos. No Experimento 2, a perda gestacional entre o D22 e D37-67

foi similar ($P>0,1$) sendo no controle (19% [36/185]), BE (15% [28/182]), e E2+P4 (15% [28/184]). No D22, o diâmetro do folículo dominante foi maior ($P<0,05$) no grupo controle ($11,9 \pm 0,14$ mm), quando comparado ao BE ($11,3 \pm 0,1$ mm) e E2+P4 ($11,5 \pm 0,1$ mm). A proporção de novilhas detectadas em estro no D24 e a intensidade de estro não diferiu ($P>0,1$) entre os grupos. Entretanto, a taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia) foi maior ($P<0,05$) no grupo BE ($0,89 \pm 0,08$) em relação ao controle ($0,59 \pm 0,07$) e E2+P4 ($0,66 \pm 0,09$). A taxa de prenhez para a segunda IATF foi maior ($P<0,05$) no grupo BE (47% [94/200]) quando comparado ao controle (37% [76/203]), mas não diferiu ($P>0,1$) para o grupo E2+P4 (43% [93/214]). A prenhez acumulada (primeira e segunda IATFs) não diferiu ($P>0,1$) entre o controle (59% [204/344]), BE (65% [227/349]) e E2+P4 (64% [220/342]). Sendo assim, é possível concluir que 1mg de BE ou 1mg de E2 associado a 9mg de P4 quando aplicados 14 dias após a IATF em novilhas de corte, antecipa a luteólise nas fêmeas não gestantes, mas não compromete a manutenção da gestação nas fêmeas que ficaram gestantes à primeira IATF. Além disso, foi possível observar que 1mg de BE, induziu a emergência de uma nova onda follicular sincronizada, além de causar um maior crescimento do folículo dominante entre o D22 e D24 e uma maior taxa de prenhez à resincronização.

4 CONCLUSÕES

Em conclusão, a administração de 1mg de BE ou 1mg de E2 + 9mg de P4 associados à um dispositivo intravaginal de P4 (novo) para a ressincronização da ovulação aos 14 dias após a IATF não comprometeu a manutenção da gestação nas novilhas que ficaram gestantes à primeira IATF, bem como antecipou a luteólise nas novilhas não gestantes. A proporção de novilhas com emergência de uma nova onda folicular entre os dias 3 e 5 após o tratamento, foi maior no grupo BE quando comparado aos demais. Além disso, o tratamento com 1mg BE resultou em uma maior taxa de crescimento do folículo dominante entre a retirada do dispositivo de P4 e a segunda IATF e aumentou a taxa de prenhez da ressincronização. Sendo assim, para novilhas o uso de 1mg de BE associado ao dispositivo de P4 no dia 14 após a IATF é uma estratégia nova e segura para a ressincronização superprecoce e possibilita uma satisfatória taxa de prenhez acumulada em um intervalo de 24 dias.

Esses resultados comprovam a primeira hipótese, que a aplicação de 1mg de BE ou 1mg de E2 não causaria luteólise nas fêmeas gestantes à primeira IATF. No entanto, a segunda hipótese em que os tratamentos seriam capazes de causar à emergência de uma nova onda folicular sincronizada, foi parcialmente comprovada, sendo observada apenas no grupo BE. Do mesmo jeito, a terceira hipótese que o BE e o E2+P4 causariam uma maior taxa de prenhez nas fêmeas ressincronizadas foi observado apenas no grupo BE.

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira dos Importadores e Exportadores de Carne. Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual 2016. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Sumario2019.aspx>. Acessado em: 30 Jul. 2019.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ANTONIAZZI, A. Q.; HENKES, L. E.; OLIVEIRA, J. F. C.; HANSEN, T. R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 176-185, 2011.

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

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*bos indicus*) using gnrh, pgf2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1121-1134, 2000.

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 anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

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

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SA FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SA, M. F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SA, M. F. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v. 12, p. S45-S52, 2018.

BAZER, F. W.; SONG, G.; THATCHER, W. W. Roles of conceptus secretory proteins in establishment and maintenance of pregnancy in ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1, 2012.

BERGFELT, D. R.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1997.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; DE SOUZA, T. A. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BO, G. A.; BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 3, p. 141-157, 2000.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; Mapletoft, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 223, 2007.

BÓ, G. A.; DE LA MATA, J. J.; BARUSELLI, P. S.; MENCHACA, A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 388-396, 2016.

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. 55, n.1, p.23-33,1999.

CAMPOS, J. T.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 619-623, 2013.

CAVALIERI, J. Effect of treatment of *Bos indicus* heifers with progesterone 0, 3 and 6 days after follicular aspiration on follicular dynamics and the timing of oestrus and ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 193, n.1, p. 9-18, 2018.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N.; JUCHEM, S. O.; THATCHER, W. W. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1389-1399, 2003.

CLEMENTE, M.; FUENTE, J. D. L.; FAIR, T.; NAIB, A. A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; Rizos, D.; Lonergan, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507-517, 2009.

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

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J. P.; MAINAR-JAIME, R. C.; GAVAGA, Q. A.; WHITTAKER, P. R.; SMALL, J. A.; MARTINEZ, M. F.; WILDE, R. E.; VEIRA, D. M.; MAPLETOFT, R. J. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. **Theriogenology** v.65, p. 557–572, 2006.

COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v. 55, n. 8, p. 772-780, 2014.

CREPALDI, G. A.; DE FREITAS, B. G.; MINGOTI, R. D.; COLLI, M. H. A.; JUNIOR, W. A. G.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 698, 2017.

CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; TEGLI, J.; MORENO, D.; BÓ, G. A. The use of estradiol and progesterone devices during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. **Theriogenology**, v. 57, p. 373, 2002.

DE OLIVEIRA, D. A. M.; KOZICKI, L. E.; GAIEVSKI, F. R.; PEDROSA, V. B.; WEISS, R. R.; SEGUI, M. S.; BERGSTEIN-GALAN, T. G. Resynchronization of ovulation with new and reused intravaginal progesterone-releasing devices without previous pregnancy diagnosis in *Bos taurus indicus* cows subjected to timed-artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 5, p. 779-785, 2019.

EL-ZARKOUNY, S.Z.; STEVENSON, J.S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3306–3321, 2004.

FARIN, C. E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R. M. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 7, p. 1099-1107, 1989.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P.; Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FLÉCHON, J. E.; FLÉCHON, B.; DEGROUARD, J.; GUILLOMOT, M. Cellular features of the extra-embryonic endoderm during elongation in the ovine conceptus. **Genesis**, v. 45, n. 11, p. 709-715, 2007.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3, p. 163-169, 2011.

FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals1. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction, fertility and development**, v. 4, n. 3, p. 301-305, 1992.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle: Role of Estradiol1. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 383-389, 2000.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal Associations among Pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF₂α, Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle¹. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O. J.; SHRERTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; IMAM, S.; BEG, M. A. Stimulation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) with estradiol-17β and changes in circulating progesterone concentrations within a PGFM pulse in heifers. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 384-392, 2010.

GRAY, C. A.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction-Cambridge**, v. 124, n. 2, p. 289-300, 2002.

GUILLOMOT, M.; MICHEL, C.; GAYE, P.; CHARLIER, N.; TROJAN, J.; MARTAL, J. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. **Biology of the Cell**, v. 68, n. 1-3, p. 205-211, 1990.

HILLIER, S. G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction**, v. 9, n. 2, p. 188-191, 1994.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acessado em: 22 Ago. 2019.

LEYVA, C.; AGUILAR, D.; MORALES, J. L.; PÉREZ-LÓPEZ, S.; VÉLIZ, F. G.; SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; MARTÍNEZ, J. M. Effects of small dose estradiol cypionate after artificial insemination on reproductive performance in Holstein cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 24-26, 2016.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BARBOSA, R. T.; MADUREIRA, E. H.; DE ALENCAR, M. M.; BINELLI, M. Taxas de serviço, concepção e prenhez de vacas nelore tratadas com gonadotrofina coriônica humana e 17²-estradiol após a inseminação artificial em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 221-230, 2008.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 307-320, 1996.

MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; DAY, A. M. Manipulating Ovaries' Follicle Wave Patterns Can Partially Synchronise Returns to Service and Increases the Pregnancy rate to Second Insemination. In: New Zealand Society of Animal Production. (**Proceedings...**) New Zealand Society of Animal Production, v. 57, 1997, p. 237.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3-4, p. 269-274, 1999.

MARQUES, M. D.; MOROTTI, F.; DA SILVA, C. B.; RIBEIRO, M.; DA SILVA, R. C. P.; BARUSELLI, P. S. Influence of category - heifers, primiparous and multiparous lactating cows - in a large-scale resynchronization fixed-time artificial insemination program. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 367-371, 2015.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BÓ, 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, n. 1, p. 37-52, 2005.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, Apr 1999.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, n. 3, p. 159-169, 2009.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCLINTOSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

PENTEADO, L.; REZENDE, R. G.; MINGOTI, R. D.; COLLI, M. H. A.; SA FILHO, M. F.; SANTOS, F. B.; MOTTA, J. C. L.; BAYEUX, B. M.; VIEIRA, L. M.; BARUSELLI, P. S. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. **Animal Reproduction**, v. 13, p. 450, 2016.

PESSOA, G.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINI, A.; FLORES, C. C. M.; VIEIRA, L. M.; Adjustment of the estradiol benzoate dose in the resynchronization protocol with unknown pregnancy status in suckled beef cows. **Animal. Reproduction.**, v.12, n.3, p.610, 2015.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; DO VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R. O.; PANDOVANI, C. R.; Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus* with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.

PUGLIESI, G.; BEG, M. A.; CARVALHO, G. R.; GINTHER, O. J. Effect of dose of estradiol-17 β on prominence of an induced 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ α (PGFM) pulse and relationship of prominence to progesterone, LH, and luteal blood flow in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, n. 2, p. 98-109, 2011.

PUGLIESI, G.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; FRANÇA, M. R.; SILVA, L. A.; BINELLI, M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 95-1, 2014.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; DA SILVA, J. C. B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v.41, n.1, p.140-150, 2017.

PUGLIESI, G.; BISINOTTO, D. Z.; MELLO, B. P.; LAHR, F. C.; FERREIRA, C. A.; MELO, G. D.; BASTOS, M. R.; MADUREIRA, E. H. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed-inseminations within 22 days. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n.8, p. 1149-1154, 2019.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RIBEIRO, E. S.; GRECO, L. F.; BISINOTTO, R. S.; LIMA, F. S.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Biology of Preimplantation Conceptus at the Onset of Elongation in Dairy Cows¹. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, 2016.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L.; DAJEE, M.; ALLISTON, T. N. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 47-54, 1998.

ROBERTS, R. M.; CHEN, Y.; EZASHI, T.; WALKER, A. M. Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 2, p. 170-177, 2008.

SA FILHO, M. F.; MARQUES, M. O.; GIROTTO, R.; SANTOS, F. A.; SALA, R. V.; BARBUIO, J. P. BARUSELLI, P. S. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 284-290, 2014.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3, p. 244-250, 2011.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Reproduction**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SENGER, P. L. Regulation of Reproduction. In: SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Segunda Edição. Current Concepts Inc., Washington State University, Pullman, WA, USA, 2003, pp. 102-125.

SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6461-6472, 2013.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph¹. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SKARZYNSKI, D. J.; PIOTROWSKA-TOMALA, K. K.; LUKASIK, K.; GALVAO, A.; FARBEROV, S.; ZALMAN, Y.; MEIDAN, R. Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 25-37, 2013.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 1144-1147, 1996.

STEVENSON, J. S.; JOHNSON, S. K.; MEDINA-BRITOS, M. A.; RICHARDSON-ADAMS, A. M.; LAMB, G. C. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 7, p. 1681-1692, 2003.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117-149, 2007.

SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Reproduction**, v. 101, n. 3, p. 547-555, 1994.

SÁNCHEZ, J. M.; MATHEW, D. J.; PASSARO, C.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. S2, p. 20-27, 2018.

THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto,14-dihydro PGF2 α and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745-756, 1986.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.;HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine- conceptus interaction and reproductive failure in cattle. **Theriogenology** v.56, n.1, p.1435-1450, 2001.

THATCHER, W. W. A 100-Year Review: Historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10272-10291, 2017.

THOMAS, R. H.; LETICIA, D. P. S.; THOMAS, E. S. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F45-F59, 2017.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. D. M.; SÁ, W. F. D.; CAMARGO, L. S. D. E. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; PUGLIESI, G.; GUERREIRO, B. M.; CRISTALDO, M. A.; BATISTA, E. O. S.; FREITAS, B. G.; CARVALHO, F. J.; GUIMARAES, L. H. C.; BARUSELLI, P. S. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color Doppler. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 378, 2014.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21-52, 2002/01/01/2002.

ZELEZNIK, A. J. The physiology of follicle selection. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 2, p. 31-31, 2004.

APÊNDICE

Elsevier Editorial System(tm) for
Theriogenology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Safe use and improved pregnancy outcomes in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI

Article Type: Original Research Article

Keywords: Resynchronization; Doppler ultrasonography; Estradiol; Luteolysis; Beef heifers.

Corresponding Author: Mr. Guilherme Pugliesi, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Federal University of Minas Gerais

First Author: Igor G Motta, DVM

Order of Authors: Igor G Motta, DVM; Cecilia C Rocha, DVM; Danilo Z Bisinotto; Gabriela D Melo, DVM; Gilmar A Ataíde Junior, DVM; Amanda G Silva, DVM; Vitor Hugo G Gonzaga, MS; José Abdon Santos, DVM; Bruno G Freitas, MS; Kleber M Lemes, PhD; Ed H Madureira, PhD; Guilherme Pugliesi, Ph.D

Abstract: We aimed to evaluate the use of estradiol benzoate (EB) or 17 β -estradiol (E2) associated with progesterone (P4) for resynchronization of ovulation at 14 days after timed artificial insemination (TAI). In Experiment 1 (Exp1), Nelore heifers were submitted to TAI (D0). On D14, the animals received an internal P4 device and were assigned in three groups: control (no treatment; n=17); EB (1mg EB; n=17); and E2+P4 (1mg E2 + 9mg P4; n=18). Ultrasonography evaluations were performed daily from D14 to D22 for follicular and luteal dynamics. On D22, devices were removed and pregnancy diagnosis was performed with Doppler ultrasonography through luteolysis detection. In Exp2, 1295 beef heifers were resynchronized and randomly allocated in the same three groups of Exp1. On D22, the dominant follicle (DF) was measured in non-pregnant (NP) and the second TAI was performed on D24. In a subgroup of heifers (n=337), an oestrus detection patch was used between D22 and D24 and the DF was measured at D24. Confirmatory diagnoses were performed between D37-67 and D43-67 after first and second TAI, respectively. In Exp1, the proportion of heifers with a synchronized follicle wave emergence (from 3 to 5 days after treatment) was greater (P<0.05) in the EB group (93.8%) than in the control (62.5%) and E2+P4 (64.7%) groups. Luteolysis occurred earlier (P<0.05) in the EB and E2+P4 groups than in the controls. The pregnancy rate after first TAI did not differ (P>0.1) among the groups at D22 and at confirmatory diagnosis in both experiments. In Exp 2, the pregnancy loss between D22 and D37-67 was similar (P>0.1) in the control (19% [36/185]), EB (15% [28/182]) and E2+P4 (15% [28/184]) groups. The DF diameter (mm) on D22 was greater (P<0.05) in the control group (11.9 \pm 0.1) than in EB (11.3 \pm 0.1) and E2+P4 (11.5 \pm 0.1). No difference (P>0.1) was observed in the proportion of heifers detected in estrus, but DF growth rate (mm/day) between D22 and D24 was greater (P<0.05) in EB group (0.9 \pm 0.08) than in control (0.6 \pm 0.07) and E2+P4 (0.7 \pm 0.09) groups. The pregnancy rate for the second TAI was greater (P<0.05) in the EB group (47% [94/200]) than in the control (37% [76/203]), but did not differ

($P > 0.1$) from the E2+P4 group (43% [93/214]). It is concluded that the administration of 1 mg EB or 1 mg E2 + 9 mg P4 at 14 days post-TAI anticipates luteolysis in NP heifers but does not compromise pregnancy. The treatment with EB induces a new synchronized follicle wave emergence and improves the pregnancy rate of resynchronized NP heifers.

***Highlights (for review)**

HIGHLIGHTS

- The administration of 1mg EB or 1mg E2 + 9mg P4 associated with the insertion of a P4 device at 14 days post-TAI did not impair the pregnancy establishment in pregnant beef heifers.
- The EB or E2 treatments anticipated the luteolysis in non-pregnant heifers.
- The 1mg EB treatment resulted in a greater growth rate of dominant follicle from P4 device removal at the second TAI and increased the pregnancy rate in resynchronized beef heifers.

Submitted to Theriogenology, September 3rd,

**Increased pregnancy outcomes in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days
after TAI**

**I.G. Motta^a, C.C. Rocha^a D.Z. Bisinotto^a, G.D. Melo^a, G.A.A. Júnior^a, A.G. Silva^a,
V.H.G. Gonzaga^a, J.A. Santos^b, B.G. Freitas^c, K.M. Lemes^d, E.H. Madureira^a, G.
Pugliesi^a**

^a Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science,
University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^b JAReprogen, Eunápolis, Bahia, Brazil

^c Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brazil

^d *Boehringer Ingelheim* Animal Health do Brasil LTDA, São Paulo, São Paulo, Brazil

Short title: Early resynchronization using estradiol

*Corresponding author. Tel.: +51 19 35654220; FAX: +51 19 35654220

Email address: gpugliesi@usp.br (G Pugliesi)

ABSTRACT

We aimed to evaluate the use of estradiol benzoate (EB) or 17 β -estradiol (E2) associated with progesterone (P4) for resynchronization of ovulation 14 days after timed artificial insemination (TAI). In Experiment 1 (Exp. 1), Nelore heifers were submitted to TAI (D0). On D14, the animals received an intravaginal P4 device and were randomly assigned to one of three groups: control (no treatment; n=17); EB (1mg EB; n=17); and E2+P4 (1mg E2 + 9mg P4; n=18). Ultrasonography evaluations were performed daily from D14 to D22 to map follicular and luteal dynamics. On D22, the P4 devices were removed and non pregnant animals were determined with Doppler ultrasonography to for luteolysis detection. In Exp. 2, 1,295 beef heifers were resynchronized and randomly allocated to the same experimental groups as described in Exp. 1. On D22, the largest follicle (LF) was measured in non-pregnant (NP) and the second TAI was performed on D24. In a subset of heifers (n=337), an estrus detection patch was used between D22 and D24 to provide results regarding estrus detection and the LF was measured at D24. Confirmatory diagnoses were performed between D37-67 and D43-67 after first and second TAI, respectively. In Exp1, the proportion of heifers with a synchronized follicle wave emergence (from 3 to 5 days after treatment) was greater ($P<0.05$) in the EB group (93.8%) than in the control (62.5%) and E2+P4 (64.7%) groups. Functional and structural luteolysis occurred earlier ($P<0.05$) in the EB and E2+P4 groups than in the controls. The pregnancy rate after first TAI did not differ ($P>0.1$) among the groups at D22 and at confirmatory diagnosis in both experiments. In Exp 2, the potential pregnancy loss between D22 and D37-67 was similar ($P>0.1$) in the control (19% [36/185]), EB (15% [28/182]) and E2+P4 (15% [28/184]) groups. The LF diameter (mm) on D22 was greater ($P<0.05$) in the control group (11.9 ± 0.1) than in EB (11.3 ± 0.1) and E2+P4 (11.5 ± 0.1). No difference ($P>0.1$) was observed in the proportion of heifers detected in estrus, but LF growth rate (mm/day) between D22 and D24 was greater ($P<0.05$) in EB group (0.9 ± 0.08) than in control (0.6 ± 0.07) and E2+P4 (0.7 ± 0.09) groups. The pregnancy rate for the second TAI was greater ($P<0.05$) in the EB group (47% [94/200]) than in the control (37% [76/203]), but did not differ ($P>0.1$) from the E2+P4 group (43% [93/214]). It is concluded that the administration of 1 mg EB or 1 mg E2 + 9 mg P4 at 14 days post-TAI anticipates luteolysis in NP heifers but does not compromise pregnancy. The treatment with EB induces a new synchronized follicle wave emergence and increase the pregnancy rate of resynchronized NP heifers.

Key words: Resynchronization; Doppler ultrasonography; Estradiol; Luteolysis; Beef heifers.

1. Introduction

In timed artificial insemination (TAI) programs, the use of resynchronization provides the opportunity for a second round of AIs and may potential increases the reproductive effectiveness of the herd [1]. This strategy is of great importance, since in addition to increasing the number of calves born from artificial insemination, eliminates the need for estrous observation [2-4], reduces the number of bulls in the farm [5].

The hormonal treatments for the resynchronization protocol can be started at different periods after the first TAI [3]. In the conventional protocol of resynchronization of ovulation, the hormonal treatments start after the pregnancy diagnosis performed around 30 days after the first TAI and the females diagnosed as non-pregnant are submitted to a similar hormonal protocol for the second TAI [5, 6]. The disadvantage of this protocol is that non-pregnant females after first TAI have a chance to become pregnant only after 40 days when the second TAI is usually performed. Alternatively, it is possible to anticipate the resynchronization and to reduce the interval between first and second TAIs by initiating the hormonal protocol on about 22 days after the first TAI, without knowing the gestational condition at the beginning of protocol [2, 7, 8]. In this resynchronization strategy, administration of the luteolytic agent and induction of ovulation occur only at the end of protocol when the non-pregnant females are identified by conventional pregnancy diagnosis using transrectal ultrasonography [8].

With the recent advent of innovative methods for early pregnancy diagnosis at 20-22 days using color Doppler ultrasonography [9, 10], a novel strategy for resynchronization has risen and a super early resynchronization around 12 to 14 days after the first TAI can be performed [11, 12]. The high accuracy (90 to 95%) reported for this method for non-pregnant diagnosis based on identification of the females with luteolysis, allows a reduction in the interval for the second TAI to 22 to 24 days after first TAI [3, 12-14]. However, the beginning of this super early resynchronization protocols coincides with a period before the maternal

recognition period of gestation (i.e., 15-17 post-estrus days), usually called as the critical period for pregnancy maintenance [15]. Therefore, the most used hormonal protocols in South America based on estradiol benzoate (EB) treatments in this period could be detrimental to maintenance of pregnancy, since 17β -estradiol (E2) is involved in the synthesis of $\text{PGF}_2\alpha$ [16-18].

Previous studies have reported that the administration of 1 or 1.5 mg of EB 13 days after insemination in beef heifers [19] and lactating dairy cows [20] induce the luteolysis, thereby impairing the establishment of pregnancy. Machado et al. [21] observed a drastic reduction in pregnancy rate at the first TAI after the administration of 5mg of E2, 12 days after insemination in beef cows (*Bos indicus*). However, Stevenson et al. [5] when using EB (1mg) 13 and 20 days after first TAI in beef cows and El-Zarkouny & Stevenson [22] when they used the same dose on days 13 and 21 after the first TAI in lactating dairy cattle and Colazo et al. [23] when administering 1.5 mg of E2 associated with 50 mg of progesterone (P4) injected on day 13, in beef heifers, did not observe negative effects on pregnancy rate. Due to the risk of negative effects of E2 and E2 esters on pregnancy establishment, a replacement with 75-100 mg injectable P4 has been suggested by Pugliesi et al. [12] and Pellegrino et al. [24], but the efficacy of P4 for suppress gonadotropin and synchronize the follicle emergence has not been supported yet.

Therefore, we aimed with the herein study to evaluate the effects of using 1 mg of EB or 1 mg of E2 associated with 9 mg of P4 in super-early resynchronization at 14 days after TAI on luteolysis induction and pregnant loss in beef females which became pregnant at first TAI and the pregnancy rate after super early resynchronization. Was hypothesized that the use of E2 or EB in low doses (1mg) at 14 days post-TAI: 1) does not induce luteolysis and compromise the pregnancy in heifers; 2) triggers synchronized emergence of a new follicular wave; and 3) results in a greater pregnancy rate in heifers inseminated after super early resynchronization.

2. Materials and methods

Experiments were submitted and approved by the ethics committee of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo institution, under the protocol number 1608300817.

2.1. Experiment 1

2.1.1. Animals and management

Experiment 1 was carried out between September and November 2017 at the Department of Animal Reproduction of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (FMVZ-USP, *campus* of Pirassununga – SP). This first experiment was conducted to evaluate whether the dose of 1mg EB or 1mg E2 associated with 9mg P4 induces luteolysis when administered 14 days after TAI in beef heifers and whether this dose is effective in causing the emergence of a new follicular wave.

In this experiment, 29 Nelore cycling heifers (*Bos taurus indicus*), aging between 16 and 18 months, weighing on average 314 ± 31 kg, and body condition score of 3 and 4 (BCS; on a scale of 1 to 5, in which 1 [emaciated] and 5 [obese]) [25] were used. Heifers were maintained on a *Brachiaria decumbens* pasture with *ad libitum* access to water and a mineral supplement during the experimental period, and received supplementation with corn silage and concentrate as established by the NRC [26].

The experiment was conducted in two replicates with 26 heifers (three heifers in each replicate were excluded because they did not respond to the synchronization protocol or because

they had some clinical or reproductive disorders). In both replicates the ovulation synchronization protocol (Figure 1) was as follows: D-10, heifers received an intravaginal P4-releasing device (1 g, Sincrogest, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, SP, Brazil) along with an i.m. administration of 2 mg EB (2 mL, i.m., Sincrodiol, Ourofino Saúde Animal). On D-2, the P4 device was removed and animals received a dose of 0.53 mg of sodium cloprostenol (2 mL, i.m., Sincrocio, Ourofino Saúde Animal), 200 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; 1 mL, i.m., SincroeCG, Ourofino Saúde Animal) and 1mg of E2 cypionate (EC; 1 mL, i.m., SincroCP, Ourofino Saúde Animal). After 48 hours of P4 device withdrawal, heifers received an application of 0.01 mg of a gonadotrophin releasing hormone analog (GnRH; 2.5 mL, i.m., Sincroforte, Ourofino Saúde Animal) and were inseminated in fixed time (D0). The heifers were inseminated by the same technician with frozen-thawed semen from one sire. On D28 of the first replicate, pregnant heifers received a luteolytic dose of PGF2 α analogue (0.53 mg of sodium cloprostenol; Sincrocio, Ourofino Saúde Animal) and 30 days after, all animals were resynchronized by the same hormonal protocol for the second replicate.

Heifers with detected ovulation 36 hours after TAI (D0), and with no disorders were randomly subdivided into three experimental groups: control group (n = 17); EB group (n = 17); and E2+P4 group (n = 18). All heifers, regardless of the groups received a new P4 intravaginal device (1 g, Sincrogest) on D14 after TAI and animals from the EB and E2+P4 group received an additional 1 mg EB (1 mL, i.m., Sincrodiol) or 1mg E2 + 9mg P4 (0.36 mL, i.m., Betaproginn, Boehringer Ingelheim, Campinas, SP, Brazil), respectively. Ultrasonography evaluations were performed daily from D14 to D22 for follicular and luteal dynamics (Figure 1). On D22, an early diagnosis of pregnancy was performed by color-Doppler ultrasonography as previously described in beef cows [9, 14]. Heifers with a functional CL (≥ 2 cm² and >25% of blood perfusion) on D22 were considered potentially pregnant and had only the intravaginal P4 device removed. In non-pregnant heifers, the resynchronization protocol was continued by

applying 1 mg of EC (1 mL, i.m., SincroCP) on D22 to induce ovulation. The ovulation was checked by ultrasonography at 24-h intervals. Confirmatory diagnosis of pregnancy was performed on D28.

2.1.2. Assay for circulating P4 concentrations

Daily blood samples were collected between D14 and D22 from the jugular vein for determination of plasma P4 concentrations and determination of time of functional luteolysis in non-pregnant heifers (5-7/group). Samples were taken using a 10 mL vacuum tube containing heparin (BD Vacutainer, São Paulo, SP, Brazil). The samples were centrifuged at 3600 x g for 15 minutes at 4 °C and the plasma was stored in the freezer at -20 °C for subsequent measurements by ELISA according to procedures reported by [27]. The intra and interassay CV were 8.2% and 25.1%, and sensitivity ranged from 0.02 to 1.29 ng/mL.

2.1.3. Ultrasonographic evaluations

Ultrasonographic exams were performed daily from D14 to day D22 after TAI by a single operator with a duplex B-mode and pulse-wave color-Doppler ultrasound instrument (MyLab Delta, Esaote Healthcare, Italy) and a linear multifrequency transducer (3,5-7,5 MHz) in B mode (RES-A, gain 50%, P 74mm, X/M, PRS 1) and color-Doppler mode (gain 61%, PRF 730Hz, frequency 6,3 MHz, WF 4, PRS 3, PRC M/2) for measurement of follicular diameter, and determination of area and blood perfusion of CL.

Ovulation was confirmed by disappearance of the dominant follicle at the ultrasonographic exam 36 h after the TAI in all animals and daily from D24 to D26 in non-pregnant heifers resynchronized. The diameter of the follicles was calculated by the mean of the maximum length and width using the calliper function while the CL area were performed through the function tracing in B mode, in which they were measured and recorded in a schematic design.

When the CL presented a cavity, it was subtracted from the total luteinized area, as previously described by Rocha et al. [28]. The animals were submitted to evaluations of the blood perfusion of CL with color-Doppler ultrasonography in which the area with colored signals was considered and a percentage was estimated in relation to the total CL area [9].

The confirmatory diagnosis of pregnancy was performed with mode B ultrasonography, 28 days after the first TAI, by detection of an embryo with heartbeats.

2.1.4. End-points

The day of the new follicular wave emergence was defined by means of a retrospective evaluation, when the dominant follicle first appeared between 5 and 6 mm [29, 30]. Heifers with a detected new follicle wave emergence occurring between 3 to 5 days after the treatment (D17-19) were considered to have a synchronized follicle wave emergence and the proportion of heifers with a synchronized wave was calculated. Heifers without a detected new follicle wave or with presence of a persistent dominant follicle from D14 to D22 were omitted from this analysis (n=3; 1 heifer/group).

The day of structural luteolysis was defined by a retrospective evaluation as the day when the CL presented for the first time area $<2\text{cm}^2$ and a blood perfusion $\leq 25\%$ [9]. The day of functional luteolysis was defined as occurring at the 24-h sample when plasma P4 concentrations decreased $>50\%$ of the average for the P4 concentrations on Days 14 and 15 [16, 31]. On D22, an early diagnosis of pregnancy was performed and the animals that presented CL with area $<2\text{cm}^2$ and a blood perfusion $\leq 25\%$ were diagnosed as non-pregnant as previously described in beef cows [9, 14]. The rate of potential pregnancy at D22 was calculated based on the number of animals with a functional CL at D22 over on the number of heifers inseminated. For pregnancy rate at D28, we considered the number of animals with an embryo with heartbeats over on the number of heifers inseminated.

2.2. Experiment 2

The second experiment was carried out during two consecutive breeding seasons (January to May of 2018 and December of 2018 to January of 2019) to evaluate whether EB or E2 increase resynchronization pregnancy rate in beef heifers submitted to super-early resynchronization. A total of 1,295 heifers, 14 to 24 months old, were used, 1178 Nelore and 117 crossbred (Nelore x Aberdeen Angus). The animals were from four commercial farms (farm 1, n=207; farm 2, n=260; farm 3, n =448; and farm 4, n=380), located in the states of Mato Grosso do Sul (n=2) and Bahia (n=1) in Brazil and in the region of El Carmen in Bolivia (n=1).

Animals were maintained in *Brachiaria decumbens* or *Panicum maximum* pastures with free access to mineralized salt and water. At the beginning of the first TAI protocol, age and BCS: in which 1 [emaciated] and 5 [obese] [24] were noted.

2.2.1. Reproductive management and treatments

All heifers (pre-pubertal and pubertal) were submitted to a protocol using an intravaginal P4 device for 10 days associated with an E2 cypionate treatment at the moment of P4 device withdrawal, owing to induce puberty in pre-pubertal animals. After 12-40 days of induction of puberty, the animals had the ovulation synchronized based on EB and P4 treatments for TAI, accordingly to the conventional protocol used in each farm (Supplemental table 1). The day of first TAI was considered as D0.

On D14, all heifers received an intravaginal P4 device (1g, Sincrogest) and were randomly assigned in each breeding groups to the same three groups of Experiment 1 (Figure 1): control (no treatment; n=433); EB (1mg EB, Sincrodiol; n=431); and E2+P4 (1mg E2 +

9mg P4, Betaproginn; n=431). All heifers were submitted to an early pregnancy diagnosis on D22 after the first TAI, using color-Doppler ultrasonography (Mindray Z5 Vet, Shenzhen, China) with a multifrequential linear B-mode transducer (frequency 7.5M; D 6.5; gain 71; FR 22; DR 120) and in Doppler mode (5.7 MHZ, gain 72, WF 260, PRF 0.7k) according to the criterion described in Experiment 1. The animals that presented a non-functional CL (non-pregnant) had the intravaginal P4 devices removed and received 1mg of EC (1 mL, i.m., SincroCP), 500 µg sodium cloprostenol (2 mL, i.m., Sincrocio) and 200 IU eCG (1 mL, i.m., SincroeCG or Ecegon). The second TAI was performed 48 hours after removal of the P4 device (D24). Thawed semen from twenty-six sires was equally assigned for the three treatment groups within each breeding groups. The females with functional CL, which was suggestive of pregnancy, had only the intravaginal P4 devices removed.

2.2.2. End-points

On D22, beyond pregnancy diagnosis, the diameter of the largest follicle of non-pregnant heifers was measured by taking the mean of the maximum length and width using the caliper function. In a subset of non-pregnant heifers (337/617) estrous detection patches (Boviflag, ABS Pecplan, Uberaba, MG, Brazil) were applied halfway between the hip and tail head to determine the occurrence of mounting behavior associated with estrus. For evaluation, they were scored from 0 to 3, based on the color change between the initial application and the second TAI (D24), in which 0 = unchanged, 1 <50% color change, 2 > 50% of change in color, and 3 = 100% change in color. The occurrence of estrus was defined when the patches were classified as 2 or 3. This same subgroup of animals was submitted to ultrasonography exams on D24 for measurement of the largest follicle and evaluation of the growth rate of this follicle in a 48-hour interval (D22 to D24).

The confirmatory diagnosis of pregnancy was performed between days D37-67 after the first TAI. A total of 125 heifers from a single breeding group were excluded for the calculation of the pregnancy rate at D37-67 due to management issues. The pregnancy diagnosis in heifers submitted to the second TAI was performed between D43-47 after the second TAI. Both diagnoses were performed using B-mode ultrasonography for detection of the embryonic vesicle with a viable embryo (presence of heartbeats).

Cumulative pregnancy rates after the first and second TAI were calculated based on the number of heifers diagnosed as pregnant in confirmatory diagnosis over on the number of heifers inseminated in the first and second TAI, respectively. Potential pregnancy loss was considered as the proportion of heifers without a viable embryo at the confirmatory diagnosis (D37-D67) from those considered pregnant on D22.

2.3. Statistical analysis

All statistical analyzes in Experiments 1 and 2 were performed using SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for each heifer as an experimental unit. The continuous dependent variables (day of emergence of the new follicular wave, day of functional and structural luteolysis, P4 concentrations, CL size and blood perfusion and follicular size) were evaluated for the normality of the residues by the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance by Levene's test. When the raw data did not follow normal distribution, data were transformed into natural logarithms or ranked. Data were analyzed by ANOVA using PROC MIXED considering the effects of treatment group (control, EB or E2+P4), pregnancy status (pregnant or non-pregnant), day (for repeated measurements of CL characteristics) and their possible interactions. The dispersion of the day of follicular wave emergence was analyzed by Bartley test. The frequency of emergence of the new follicular wave that occurred between days

3 and 5 after treatment and the proportion of ovulated heifers within 72 hours from D22 was evaluated by Fisher's exact test using the PROC FREQ of SAS.

Dependent variables (pregnancy rate, potential pregnancy loss and occurrence of estrus) were analyzed by the GLIMMIX procedure using a binomial distribution. Multivariable models were built and a backward stepwise elimination method was applied, considering the Wald's criterion (factors with $P > 0.2$ are excluded from the model). For pregnancy rate and potential pregnancy loss, the initial statistical model was composed of the fixed effects of treatment group, breed (Nelore or NelorexAngus cross), breeding groups (n=15), body condition (1 to 5), farm (n=4), bull (n=26), technician (n=7) and their possible interactions. The final model for pregnancy rate and potential pregnancy loss included only the main effects of treatment group and breeding groups. Already for the occurrence of estrus the final model included only the effect of treatment group.

The average values were compared between treatments, when necessary, using Fisher's protected least significant difference (LSD, i.e., the DIFF option of the LSMEANS statement). Results were expressed as mean \pm SEM. Significant differences were declared at $P < 0.05$ and a tendency was declared at $0.05 \leq P \leq 0.1$.

3. Results

Experiment 1

The day of follicular wave emergence (Table 1) did not differ ($P > 0.1$) among the experimental groups and was not affected ($P > 0.1$) by pregnancy status (pregnant and non-pregnant). Although no difference ($P > 0.1$) in the dispersion of the day of follicular wave emergence was detected among the groups (Figure 2), the proportion of heifers with a synchronized follicle wave emergence (from 3 to 5 days after treatment) was greater ($P < 0.05$) in the EB group (93.8%; 15/16) than in the control (62.5%; 10/16) and E2+P4 (64.7%; 11/17)

groups. There was no difference ($P>0.1$) between the control, EB and E2+P4 groups in the diameter (mm) of the dominant follicle at D22, regardless of the pregnancy condition (Table 1). However, the size of dominant follicle was greater ($P<0.05$) in non-pregnant heifers when compared to the pregnant heifers (11.7 ± 0.68 vs. 8.0 ± 0.44 mm), regardless of the treatment group. The proportion of heifers that ovulated within 72 hours from ovulation induction (D22) did not differ ($P>0.1$) among the control (80% [4/5]), EB (80% [4/5]) and E2+P4 (100% [7/7]) groups.

The time of functional and structural luteolysis in non-pregnant heifers was anticipated ($P<0.05$) in the EB and E2+P4 groups, when compared to the control group (Table 1). When the data of area and CL blood perfusion was analyzed over D14 to D22 in the pregnant heifers (Figure 3), only a significant ($P<0.05$) effect of time was observed. The time effect in the CL blood perfusion reflected a decrease from D14 to D16, followed by an increase from D16 to D19, regardless of the treatment group. For CL area, the time effect reflected a decrease from D15 to D19. Pregnancy rates at early (D22) and confirmatory (D28) pregnancy diagnoses did not differ ($P>0.1$) between the control, EB and E2 + P4 groups (Table 1).

Experiment 2

No interaction between treatment group and breed, farm, breeding groups, sire, technician or BCS was observed for pregnancy rates at D22 and confirmatory diagnosis (D37-67) of the first TAI, potential pregnancy loss and pregnancy rates of the second TAI.

In one breeding group lot ($n=260$) the confirmatory diagnosis was not performed in the 125 heifers that were potential pregnant at D22 (functional CL) due to management issues. Regardless the treatment group, the overall pregnancy rates for the first TAI, second TAI, and cumulative (first and second TAIs) were, respectively, 44.4% (460/1035), 40.2% (194/482) and 63.2% (654/1035). For the first TAI, no effect ($P>0.1$) of treatment group was observed for the

pregnancy rates at D22 or D37-D67 (Figure 4). Also, the potential pregnancy loss between the early pregnancy diagnosis at D22 and the confirmatory diagnosis at D37-D67 did not differ ($P>0.1$) among treatment groups (Figure 4).

For the second TAI, the diameter (mm) of largest follicle at D22 differed ($P<0.05$) among the groups, as observed by the larger ($P<0.05$) follicle in the control group than in the EB and E2+P4 groups (Table 2). In the subgroup of heifers evaluated at the time of the second TAI (D24), there was no difference ($P>0.1$) among the groups for the largest follicle diameter (Table 2). However, the largest follicle growth rate (mm/day) from D22 to D24 was greater ($P<0.05$) in the EB group, than in the control and E2+P4 groups (Table 2). The occurrence of estrus did not differ ($P>0.1$) among the control (62.2%; 69/111), EB (62.1%; 72/116) and E2+P4 (66.4%; 73/110) groups, as well as the intensity of estrus (0-3), which was for the control, EB and E2+P4 groups, respectively, 1.89 ± 0.11 , 1.84 ± 0.11 and 1.86 ± 0.11 .

A significant effect ($P<0.05$) of treatment group was observed for the pregnancy rate in heifers submitted to the second TAI (Figure 5). The pregnancy rate was greater ($P<0.05$) in the EB group when compared to the control group, but was not different ($P>0.1$) in the E2+P4 group compared to the others (Figure 5). The cumulative pregnancy rate (first and second TAIs) did not differ ($P>0.1$) between the control, EB and E2+P4 groups (Figure 5).

4. Discussion

Results from the current study indicated that it is feasible to use 1 mg EB or 1 mg E2 associated with 9 mg P4 along with an intravaginal P4 device on Day 14 after the first TAI, without detrimental effects on a pre-established pregnancy in beef heifers. Also, the addition of 1mg EB at the beginning of the super-early resynchronization protocol (D14) increased the pregnancy rate in heifers submitted to the second TAI.

The Hypothesis 1 that the use of E2 or EB in low doses (1mg) at 14 days post-TAI does not induce luteolysis and does not compromise the pregnancy in heifers was supported. This was indicated by: 1) the similar CL characteristics from D14 to D22 among the treatment groups in pregnant heifers; and 2) the similar pregnancy rates in both experiments at early (D22) and confirmatory diagnoses after the first TAI between the heifers treated with EB or E2+P4 and the heifers receiving only the P4 device. In addition, the potential pregnancy loss did not differ among the groups. The use of E2 or E2 esters at this period of pregnancy is controversial since previous studies have indicated negative or neutral effects. A early study in *Bos taurus* subspecies reported a impairment of CL functionality in dairy cattle after the injection of 1.5 mg [20] EB on day 13 of gestation and lower pregnancy rate at the first TAI in dairy cows [20] and beef heifers [19]. Additionally, Machado et al. [21] observed that application of 5mg E2 on day 12 after TAI in non-lactating Nelore cows dramatically reduced the pregnancy rate at the first TAI and this effect remained during the breeding season as cumulative pregnancy was also lower. However, the herein results corroborate with other previous reports, where the application of 1mg EB at day 13 after TAI in dairy and beef cows did not affect the pregnancy rate at the first TAI [5, 19, 22]. Also, Macmillan et al. [32] when applying 1mg EB on days 12, 13 and 14 after insemination, observed that the pregnancy rate at the first insemination did not differ between EB-treated and the untreated lactating dairy cows. In addition, when 1mg E2 associated with 50mg of P4 was administered on day 13 after the TAI in beef heifers, the pregnancy rate at the first insemination did not differ between E2-treated and untreated groups [23].

Although the previous reports indicate controversial results of the E2 effects on pregnancy maintenance, most studies were conducted in *Bos taurus* subspecies, except for the work of Machado et al. [21], where Nelore (*Bos indicus*) cows were used. However, in this later study the E2 dose was much greater (5-fold) when compared to that used in the present study.

Therefore, the differences in dose and subspecies used (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*) may be an explanation for the inconsistent results and why E2 did not compromise the pregnancy in pregnant heifers of the herein study where 1 mg of EB or E2 were used in *Bos indicus* heifers. However, an alternative hypothesis for this inconsistency is the association of dose and moment of the E2 or EB treatments. Several previous studies where pregnancy maintenance was compromised used E2 or EB at day 13 after insemination, but in the present study the E2+P4 or EB was given on day 14, which could have allowed more time for a greater embryo development and secretion of IFN- τ for blocking the luteolytic cascade. In this regard, Ribeiro et al. [33] observed a pronounced difference in the embryonic development on embryos recovered from Holstein cows on day 15 after TAI and suggested that a more developed and elongated embryo at this moment is more suitable for inhibition of luteolysis and pregnancy success. Concentration of IFN- τ in the uterine fluid is lower for cows with ovoid conceptus, intermediate for those with tubular shape and greater for cows with filamentous conceptuses. Thus, a potential difference in embryo development during first two weeks of pregnancy between *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds could have accounted for the no detrimental effect of E2 or EB on Nelore heifers, but further studies are needed to mitigate the effects of E2 at different time periods and to compare the conceptus development between *Bos taurus* and *Bos indicus*. For this purpose, it is essential to understand the effects and interactions of dose, timing, breed and animal category.

The Hypothesis 2 that the use of E2 or EB in low doses (1mg) at 14 days post-TAI triggers a synchronized emergence of a new follicular wave in heifers was partially supported. This was indicated by the effective synchronization of follicle wave emergence only in the EB-treated heifers. Although no statistical difference in the dispersion of the day of follicular emergence between the groups was detected in Experiment 1, it was observed (Figure 2) that the emergence in the EB group was concentrated between days 3 and 5 after the treatment, while in the other

groups occurred from 0 to 7 days. This resulted in a greater proportion of heifers with a synchronized follicle wave emergence in the EB group (93.8%) compared to the control and E2+P4 groups (62.5-64.7%). Therefore, only the EB treatment was successful in inducing a synchronized follicle wave emergence (from 3 to 5 days after treatment). This is in agreement with a previous report [34], which indicated that a low EB dose (1 mg) was efficacious as a high dose of E2 (5 mg) in synchronizing follicular wave emergence in beef heifers, and the emergence occurred from 3 to 6 days after the treatment with 1mg EB. A limiting factor for not detecting a difference in the dispersion of follicle wave emergence between E2+P4-treated and non-treated heifers may have been the dose of E2 used. Although Bó et al. [35] demonstrated that the application of 1 mg of E2 was as effective as 5 mg of E2 in suppressing follicles in progestogen-implanted *Bos taurus* beef heifers, the dose of E2 herein used (1mg) could not be enough for suppressing FSH and induce follicle turnover in *Bos indicus* subspecies. The new follicular wave in *Bos taurus* heifers occurred 2 to 4 days after the treatment in the later study, but occurred very disperse, from 0 to 6 days after in E2+P4-treated heifers, in the present study.

Although negative effects on CL function and pregnancy maintenance were not observed, the application of 1 mg of EB or E2+P4 anticipated luteolysis on about 2 days in non-pregnant females after first TAI in Experiment 1. Our results are in agreement with previous studies reporting anticipated luteolysis after BE treatment on day 13 or 15 after ovulation in Holstein and crossbred heifers [16]. In addition, the treatment with E2 doses 10 to 20 times lower than the dose used in the present study, when administered 14 days after ovulation in non-inseminated dairy heifers resulted in increased plasma PGFM concentrations within 6 hours after the treatment and also induced luteolysis [36, 37]. Therefore, the present and previous results [36, 37] indicate that the absence of a viable and developed conceptus secreting IFN- τ probably did not block the expression of E2 receptors in the endometrium and E2 acted inducing synthesis

of PGF2 α and luteolysis in the present study. Therefore, the effects of EB or E2 treatments on PGF2 α synthesis in pregnant animals need to be further investigated.

The Hypothesis 3 that the use of E2 or EB in low doses (1mg) at 14 days post-TAI results in a greater pregnancy rate in heifers inseminated after resynchronization was partially supported. The expected improvement in pregnancy rates using E2 or EB was only observed for heifers receiving 1mg EB, as observed by 25% increase (37.4% vs. 47%) in the pregnancy rate at the second TAI in EB-treated heifers compared to the controls; whereas, the pregnancy rates in the E2+P4 treated heifers was intermediate (43.5%). Our current hypothesis for this improvement is that the anticipated luteolysis caused by the EB or E2 treatments in non-pregnant heifers favoured the pregnancy rate at the second TAI, but the better synchronization of follicular wave emergence and the increased growth of largest follicle were detrimental to increase the pregnancy outcome observed in EB-treated heifers. In this regard, reduced circulating P4 concentrations during dominant follicle development favors the pregnancy rates in beef animals submitted to TAI [38]. This effect is caused by the association of lower P4 concentrations during dominant follicle growth with greater frequency of LH pulses, size of pre-ovulatory follicle and ovulation rate [39, 40]. In addition, earlier induction of luteolysis during TAI protocols in beef cows results in a more vascularized preovulatory follicles and a larger and more vascularized corpus luteum at early diestrus that results in greater pregnancy rates [41, 42]. Thus, it is fair to suggest that the anticipation of luteolysis resulted in increased LH pulsatility during final follicle growth and its association with a synchronized follicle wave emergence in heifers treated with EB ensured the greater development of dominant follicle between D22 and D24 and pregnancy rate.

In addition, a greater size of the largest follicle on D22 (day of P4 device removal) was observed in the control heifers in Experiment 2, but the diameter of the largest follicle on D24 was similar among the groups. This could have occurred because of persistence of dominant

follicles present at D14 and consequently absence of a new follicular wave in heifers not treated with E2 or EB. In this regard, a quadratic association is observed between the size of ovulatory follicle and pregnancy rates, where very large follicles (≥ 16 mm in diameter) culminate in lower pregnancy rate [43-46]. In addition, Meneghetti et al. [38] suggested that the endocrine environment during proestrus may be a more consistent predictor of fertility than ovulatory follicle size. In this sense, other factors as follicle growth rate and preovulatory follicle function regulate the time and prominence of changes in P4 and E2 concentrations during proestrus [47]. Therefore, the 50% greater final growth of the largest follicle emerged from a synchronized wave in EB-treated heifers could have resulted in greater fertilization rate and embryo survival.

Although the cumulative pregnancy rate was low (64%), with this protocol it is possible to reduce the interval between inseminations to 24 days and increase the service rate [3]. In addition, heifers may not have responded to the cyclicity induction protocol and this impacted the overall pregnancy rate.

In conclusion, the administration of 1mg EB or 1mg E2 + 9mg P4 associated with the insertion of a P4 device for resynchronization of ovulation at 14 days post-TAI does not impair the pregnancy establishment in pregnant beef heifers from the first TAI. The EB or E2 treatments anticipated the luteolysis in non-pregnant heifers, but a resynchronized follicular wave emergence was only observed in EB-treated heifers. Finally, the 1mg EB treatment resulted in a greater growth rate of largest follicle from P4 device removal to TAI and increases the pregnancy rate in resynchronized beef heifers. The association of an intravaginal P4 device with 1mg EB at D14 after TAI is a novel and safe option for super-early resynchronization in heifers.

Acknowledgments

This work was supported by Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/10606-9). The authors thank Camila Cupper Vieira, Bruno Bastos, Rogerio Garcia, Jerónimo Moreno, Enrique Fabiela, Angel Osio Martinez for all their help during the execution of the first experiment; the companies Ourofino Animal Health and Boehringer Ingelheim for supplying the products; the companies JAreprogen and Geneplan for assistance in animal handling; the Canaã, Cerro Alto, Duas Barras and Querência farms; the administration of the Pirassununga campus of the University of São Paulo, and FAPESP for a scholarship (2017/18613-0) to first author.

References

- [1] Crepaldi GA, Freitas BG, Mingoti RD, Colli MHA, Gonçalves Junior WA, Ferreira RM, et al. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. *Animal Reproduction*. 2017;14:698.
- [2] Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*. 2016;86:388-96.
- [3] Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA, Elliff FM, Sa MF, Vieira L, et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Animal Reproduction*. 2017;14:558-71.
- [4] Bó GA, Huguenine E, de la Mata JJ, Nunez-Olivera R, Baruselli PS, Menchaca A. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*. 2018;15:952-62.
- [5] Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, Richardson-Adams AM, Lamb GC. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *Journal of Animal Science*. 2003;81:1681-92.
- [6] Marques MD, Morotti F, da Silva CB, Ribeiro M, da Silva RCP, Baruselli PS, et al. Influence of category - heifers, primiparous and multiparous lactating cows - in a large-scale resynchronization fixed-time artificial insemination program. *Journal of Veterinary Science*. 2015;16:367-71.
- [7] Sá MF, Marques MO, Girotto R, Santos FA, Sala RV, Barbuio JP, et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*. 2014;81:284-90.
- [8] Campos JT, Marinho LSR, Lunardelli PA, Morotti F, Seneda MM. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 2013;80:619-23.
- [9] Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biology of reproduction*. 2014;91:95-1.
- [10] Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CAC, et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*. 2013;96:6461-72.
- [11] Penteado L, Rezende RG, Mingoti RD, Colli MHA, Santos FB, Bayeux BM, et al. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. *Animal Reproduction*. 2016;13:450.
- [12] Pugliesi G, Bisinotto DZ, Mello BP, Lahr FC, Ferreira CA, Melo GD, et al. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed-inseminations within 22 days. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019;0.
- [13] Pugliesi G, Rezende RG, Lopes E, Nishimura TK, Baruselli PS, Madureira EH, et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos.
- [14] Pugliesi G, de Melo GD, Jr GAA, Pellegrino CAG, Silva JB, Rocha CC, et al. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. *Anim Reprod*. 2018;15:239-46.
- [15] Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*. 2001;56:1451-63.
- [16] Araujo RR, Wiltbank MC, Beg MA, Ginther OJ, Ferreira JC, Palhão MM. Role of Follicular Estradiol-17beta in Timing of Luteolysis in Heifers¹. *Biology of Reproduction*. 2009;81:426-37.

- [17] Pugliesi G, Khan FA, Hannan MA, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. *Theriogenology*. 2012;78:443-54.
- [18] Thatcher WW, Terqui M, Thimonier J, Mauleon P. Effect of estradiol-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto, 14-dihydro PGF 2α and luteolysis in cyclic cattle. *Prostaglandins*. 1986;31:745-56.
- [19] Cutaia L, Tríbulo R, Tegli J, Moreno D, Bó GA. The use of estradiol and progesterone devices during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. *Theriogenology*. 2002;57:373.
- [20] Vieira LM, Sá Filho MF, Pugliesi G, Guerreiro BM, Cristaldo MA, Batista EOS, et al. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color Doppler. *Animal Reproduction*. 2014;11:378.
- [21] Machado R, Bergamaschi MACM, Barbosa RT, Madureira EH, de Alencar MM, Binelli M. Taxas de serviço, concepção e prenhez de vacas nelore tratadas com gonadotrofina coriônica humana e 17 α -estradiol após a inseminação artificial em tempo fixo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2008;45:221-30.
- [22] El-Zarkouny S, Stevenson JS. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. *Journal of Dairy Science*. 2004;87:3306-21.
- [23] Colazo MG, Kastelic JP, Mainar-Jaime RC, Gavaga QA, Whittaker PR, Small JA, et al. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*. 2006;65:557-72.
- [24] Pellegrino CAG, Claro Júnior I, Meneghetti M, Júnior A, Arantes G, Grázia JG, et al. Different CIDR-based resynchronization protocols after embryo transfer in beef recipients submitted to early pregnancy diagnosis by Doppler ultrasonography. *Animal Reproduction*. 2018;15:320.
- [25] Ayres H, Ferreira RM, de Souza Torres-Júnior JR, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Science*. 2009;123:175-9.
- [26] National Academies of Sciences EaM. Nutrient requirements of beef cattle: National Academies Press; 2016.
- [27] Al-Dujaili EAS, Mullins LJ, Bailey MA, Kenyon CJ. Development of a highly sensitive ELISA for aldosterone in mouse urine: Validation in physiological and pathophysiological states of aldosterone excess and depletion. *Steroids*. 2009;74:456-62.
- [28] Rocha CC, Martins T, Cardoso BO, Silva LA, Binelli M, Pugliesi G. Ultrasonography-accessed luteal size endpoint that most closely associates with circulating progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in beef cows. *Animal Reproduction Science*. 2019;201:12-21.
- [29] Buratini J, Price CA, Visintin JA, Bo GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*. 2000;54:421-31.
- [30] Edwards SAA, Phillips NJ, Boe-Hansen GB, Bo GA, Burns BM, Dawson K, et al. Follicle stimulating hormone secretion and dominant follicle growth during treatment of *Bos indicus* heifers with intra-vaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, equine chorionic gonadotrophin and prostaglandin F 2α . *Animal Reproduction Science*. 2013;137:129-36.
- [31] Pugliesi G, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ. Induction of PGFM pulses and luteolysis by sequential estradiol-17 β treatments in heifers. *Theriogenology*. 2012;77:492-506.
- [32] Macmillan KI, Taufa VK, Day AM. Manipulating ovaries follicle wave patterns can partially synchronise returns to service and increase the fertility of second inseminations. *NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PROD PUBL*. p. 237, 1997.

- [33] Ribeiro ES, Greco LF, Bisinotto RS, Lima FS, Thatcher WW, Santos JE. Biology of Preimplantation Conceptus at the Onset of Elongation in Dairy Cows¹. *Biology of Reproduction*. 2016;94.
- [34] Martínez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*. 2005;86:37-52.
- [35] Bó GA, Bergfelt DR, Brogliatti GM, Pierson RA, Adams GP, Mapletoft RJ. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science*. 2000;59:141-57.
- [36] Pugliesi G, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ. Effect of dose of estradiol-17 β on prominence of an induced 13,14-dihydro-15-keto-PGF 2α (PGFM) pulse and relationship of prominence to progesterone, LH, and luteal blood flow in heifers. *Domestic Animal Endocrinology*. 2011;41:98-109.
- [37] Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ, Imam S, Beg MA. Stimulation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF 2α (PGFM) with estradiol-17 β and changes in circulating progesterone concentrations within a PGFM pulse in heifers. *Theriogenology*. 2010;74:384-92.
- [38] Meneghetti M, Sa OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*. 2009;72:179-89.
- [39] Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Fike KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of Animal Science*. 1996;74:1424-40.
- [40] Stock AE, Fortune JE. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 1993;132:1108-14.
- [41] Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:5268-73.
- [42] Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JRG, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 2016;85:1239-48.
- [43] Pfeifer LFM, Leal SdCBdS, Schneider A, Schmitt E, Corrêa MN. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2012;41:1004-8.
- [44] Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Meneghetti M, Dias CC, Sá Filho OG, Peres RFG, et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Animal Reproduction*. 2013:206-14.
- [45] Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *Reproduction*. 1996;106:39-47.
- [46] Colazo MG, Kastelic JP, Small JA, Wilde RE, Ward DR, Mapletoft RJ. Resynchronization of estrus in beef cattle: ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *The Canadian veterinary journal*. 2007;48:49-56.
- [47] Binelli M, Pugliesi G, Hoeck VV, Sponchiado M, Ramos RS, Oliveira ML, et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal Reproduction*. 2014:246-53.

Table 1. Follicular wave emergence days (pregnant and non pregnant), dominant follicle diameter at day 22 (pregnant and non pregnant) structural luteolysis days, pregnancy rate (%) at day 22 and day 28 of heifers on the control group, group EB, or group E2+P4, treated on day 14 after the first TAI.

	Control (n= 17)	EB (n= 17)	E2+P4 (n=18)
Follicular wave emergence (days)			
Pregnant¹	3.2 ± 0.54	4.1 ± 0.41	3.9 ± 0.43
Non pregnant²	2.8 ± 0.58	4.0 ± 0.45	2.4 ± 0.57
Dominant follicle on D22 (mm)			
Pregnant¹	8.3 ± 0.45 ^x	7.4 ± 0.47 ^x	8.3 ± 0.39 ^x
Non pregnant²	11.9 ± 0.94 ^y	10.9 ± 0.64 ^y	12.3 ± 0.47 ^y
Luteolysis (days)			
Functional²	19.3 ± 0.63 ^A	18.0 ± 0.58 ^B	18.0 ± 0.0 ^B
Structural²	20.6 ± 0.4 ^A	18.6 ± 0.51 ^B	19.1 ± 0.46 ^B
Pregnancy rate on D22	70.6% (n= 12/17)	70.6% (n= 12/17)	61.1% (n= 11/18)
Pregnancy rate on D28	64.7% (n= 11/17)	64.7% (n= 11/17)	61.1% (n= 11/18)

^{A B} Different upper case letters on the same row indicate a difference (P<0.05) between groups by the LSD test.

^{x y} Lower case letters in the same column indicate a difference (P<0.05) between pregnant and non-pregnant heifers in the same treatment group by the LSD test.

¹ Number of heifers in each group, control (n= 12), EB (n= 12) and E2+P4 (n= 11).

² Number of heifers in each group, control (n= 5), EB (n= 5) and E2+P4 (n= 7).

Table 2. Diameter (mm) of the dominant follicle on days 22 and 24 after TAI and follicle growth rate (mm/day) from day 22 to 24 after TAI in beef heifers resynchronized 14 days after TAI with an intravaginal P4 device only (control group), or associated with 1mg estradiol benzoate (EB group) or 1mg estradiol + 9mg progesterone (E2+P4).

	Control	EB	E2+P4
Diameter of dominant follicle (mm)			
D22	11.9 ± 0.14 ^A (n= 203)	11.3 ± 0.14 ^B (n= 200)	11.5 ± 0.13 ^B (n= 214)
D24	13.1 ± 0.24 (n= 111)	13.0 ± 0.21 (n= 116)	13.0 ± 0.23 (n=110)
Follicle growth rate from D22 to D24 (mm/day)	0.59 ± 0.07 ^B (n= 111)	0.89 ± 0.08 ^A (n= 116)	0.66 ± 0.09 ^B (n= 110)

^{A B} = Different upper cases letters on the same line indicate statistical difference (P<0.05) by the LSD test.

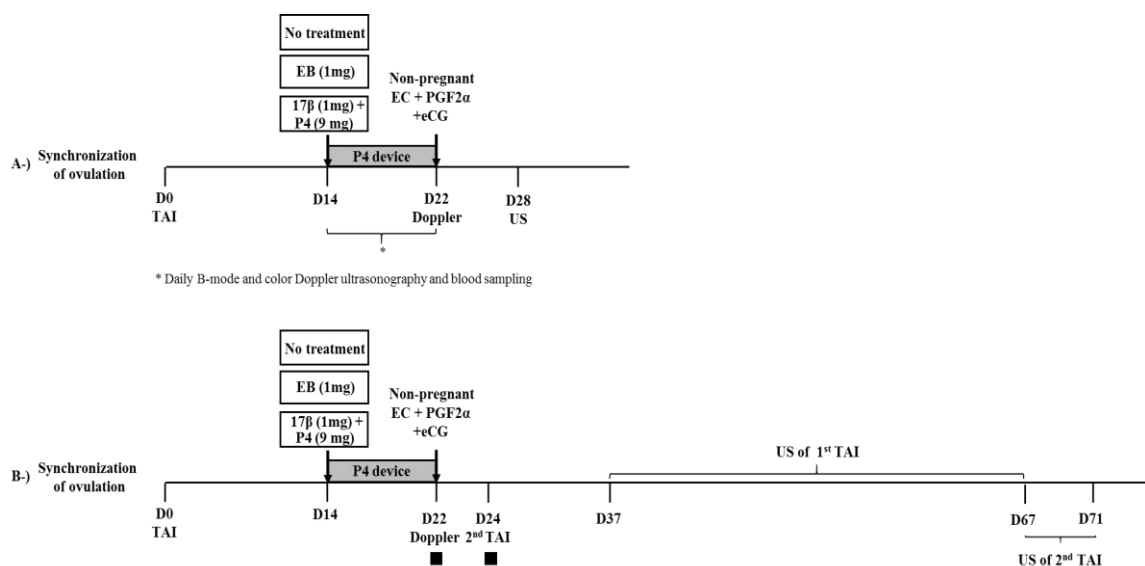


Fig.1. A) Experimental design of Experiment 1. On D14 after TAI (D0), heifers received a new intravaginal device of P4 and were split in three groups: control (no further treatment, n= 17), 1mg estradiol benzoate (EB group, n= 17), or 1mg 17β-estradiol (E2) + 9mg progesterone (E2+P4 group, n= 18). Blood samples were collected and ultrasonography evaluations (B/Doppler modes) were performed daily from D14 to D22. On D22, devices were removed and pregnancy diagnosis was performed by luteolysis detection using Doppler ultrasonography. Non-pregnant heifers received 1mg of estradiol cypionate, 500μg of sodium cloprostenol and 200 IU of eCG on D22. While pregnant heifers had only P4 devices withdrawn. Confirmatory diagnosis of pregnancy was performed at D28. B) Experimental design of Experiment 2. On D14, heifers were randomly split to the same control (n= 433), EB (n= 431) and E2+P4 (n= 431) of Experiment 1, but a second TAI was performed on D24. In a subgroup of non-pregnant heifers (n=337) (black square), an estrous detection patch was used between D22 and D24, and dominant follicle was measured at D24. Confirmatory diagnoses were performed between D37-67 after first TAI, and 43-47 days after second TAI.

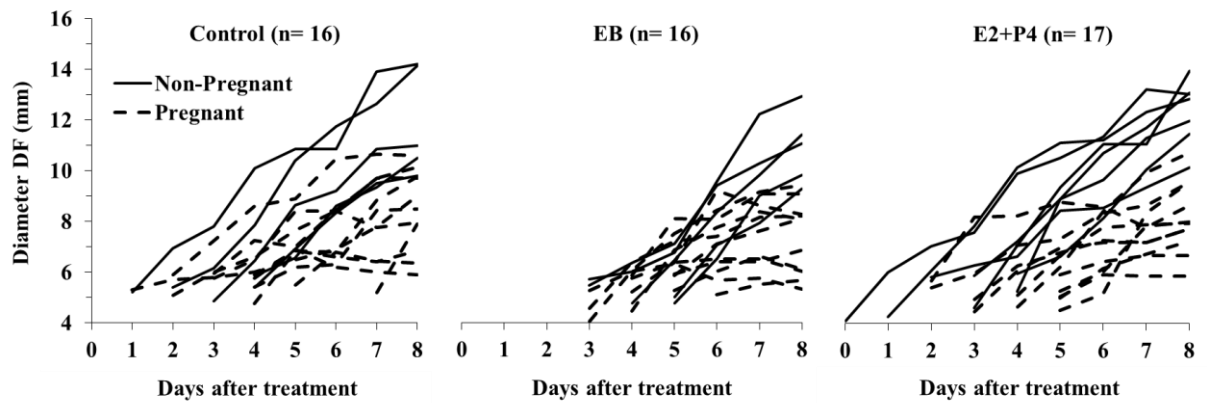


Fig.2. Distribution of the day of follicular wave emergence and the size of the new dominant follicle in beef heifers resynchronized 14 days after TAI with an intravaginal P4 device only (control group, n= 16) or associated with 1mg estradiol benzoate (EB group, n = 16), or 1mg estradiol + 9mg progesterone (E2+P4, n= 17).

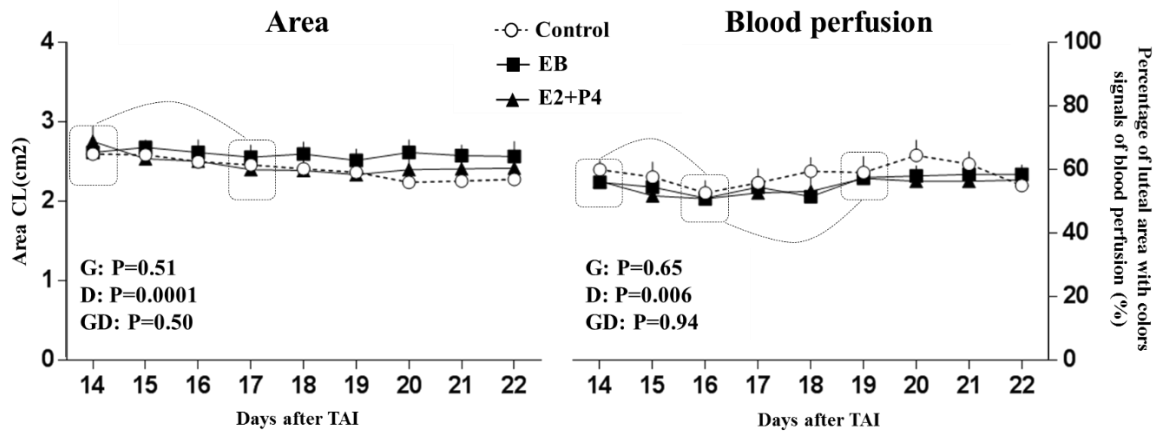


Fig.3. Mean \pm SEM CL area (cm²) and blood perfusion in pregnant beef heifers resynchronized 14 days after TAI with an intravaginal P4 device only (control group, n= 12) or associated with 1mg estradiol benzoate (EB group, n = 12), or 1mg estradiol + 9mg progesterone (E2+P4, n= 11). The first significant (P<0.05) increase or decrease is indicated by dashed curves and boxes between the days.

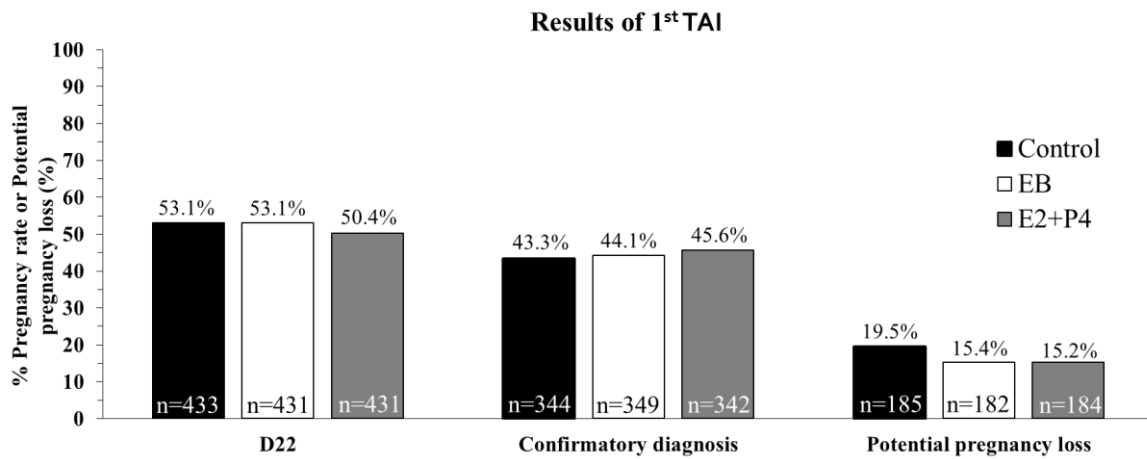


Fig.4. Pregnancy rate (%) at day 22 and at the confirmatory diagnosis, and potential pregnancy loss (%) in beef heifers (n=431-433/group) resynchronized 14 days after TAI with an intravaginal P4 device only (control group), or associated with 1mg estradiol benzoate (EB group) or 1mg estradiol + 9mg progesterone (E2+P4). No difference ($P>0.1$) was observed among the treatment groups.

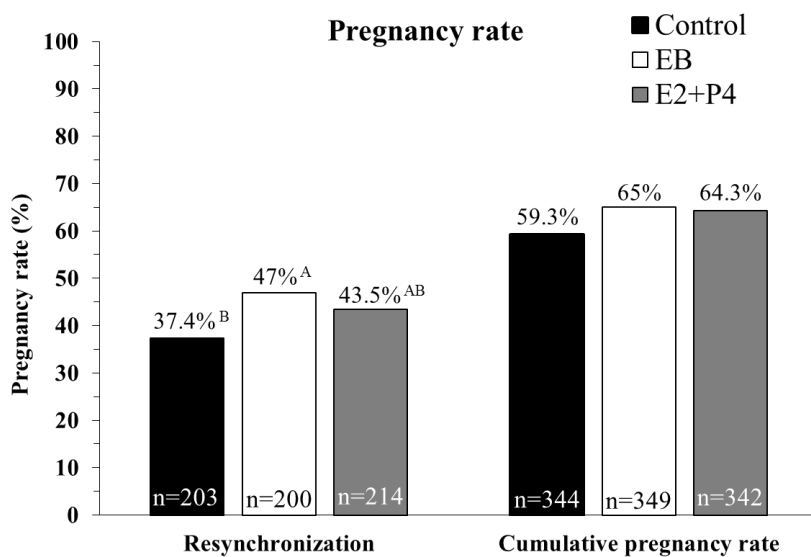


Fig.5. Pregnancy rates (%) at Day 43-47 after resynchronization and cumulative pregnancy rate (%) at first and second TAI in beef heifers resynchronized 14 days after TAI with an intravaginal P4 device only (control group), or associated with 1mg estradiol benzoate (EB group) or 1mg estradiol + 9mg progesterone (E2+P4). ^{AB} = Different upper case letters indicate a difference (P<0.05).

Supplementary Table

Farm	Day -10		Day -2		Day 0	
	P4-releasing device	EB ¹	PGF2 α ²	eCG ³	EC ⁴ /EB	TAI ⁵ moment
1	CIDR	Gonadiol, 2mg	Dinoprost trometamine, 12.5mg, Lutalyse	Novormon, 200 IU	EC, ECP, 1mg	48 hours after the application of EC
2	CIDR	Gonadiol, 2mg	Dinoprost trometamine, 12.5mg, Lutalyse	Novormon, 300 IU	EC, ECP, 1mg	48 hours after the application of EC
3	Cronipress	Bioestrogen, 2mg	D-Cloprostenol, 150 μ g, Croniben	Ecegon, 200 IU	EC, Croni-CIP, 1mg	48 hours after the application of EC
4	Progestar	Estrovolinn, 2mg	Cloprostenol, 500 μ g, Cioprostinn	Ecegon, 200 IU	EB, Estrovolinn, 1mg	36 hours after the application of EB

¹ Estradiol benzoate.

² Prostaglandin F2 α .

³ Equine chorionic gonadotropin.

⁴ Estradiol cypionate.

⁵ Timed Artificial Insemination.

Farm 1 and 2 used protocol from the company Zoetis, São Paulo, Brazil.

Farm 3 used protocol from the company Biogénesis Bagó, Curitiba, Brazil.

Farm 4 used protocol from company Boehringer Ingelheim with eCG from Biogénesis Bagó.