

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Inseminações Sincronizadas com Intervalo de 21 Dias em  
Novilhas Nelores não Gestantes após Diagnóstico Precoce  
de Gestação com Ultrassonografia Doppler**

**João Paulo Nascimento Andrade**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**INSEMINAÇÕES SINCRONIZADAS COM INTERVALO DE  
21 DIAS EM NOVILHAS NELORES NÃO GESTANTES APÓS  
DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO COM  
ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER**

**JOÃO PAULO NASCIMENTO ANDRADE**

*Sob a orientação do Professor*  
**Marco Roberto Bourg de Mello**

*e Co-orientação do Professor*  
**José Nélio de Sousa Sales**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A553i Andrade, João Paulo Nascimento, 1992-  
Inseminações Sincronizadas com Intervalo de 21 Dias  
em Novilhas Nelores não Gestantes após Diagnóstico  
Precoce de Gestação com Ultrassonografia Doppler /  
João Paulo Nascimento Andrade. - 2019.  
41 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.  
Coorientador: José Nélío de Sousa Sales.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Pós Graduação em Medicina  
Veterinária, 2019.

1. Reprodução em Bovinos. 2. Ultrassonografia  
Doppler. 3. Eficiência Reprodutiva. I. Mello, Marco  
Roberto Bourg de, 1971-, orient. II. Sales, José  
Nélío de Sousa, -, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Medicina  
Veterinária. IV. Título.

## **Dedicatória**

Para Fabiana Sonnewend Andrade.

## **Agradecimentos**

A Deus pelo dom da vida e por sempre caminhar ao meu lado dando-me suporte. Aos meus pais Zenildo e Cidinha e meu irmão João Luiz por todo sacrifício que fizeram para que eu pudesse estudar principalmente pelo amor incondicional e exemplos de caráter, humildade e honestidade. Meus tios e primos que de forma direta ou indireta me ajudaram.

A minha esposa Fabiana, pelo carinho e paciência nesses dois anos de mestrado, sempre junto comigo em todos os projetos no calor de mais de 40° do Acre até o frio de menos 40° de Madison, sem você não sou nada meu amor!

Ao meu orientador Marco Mello, desde a graduação me ensinando que mais que ser bom profissional ou pesquisador é preciso saber ter compromisso, respeito e educação no ambiente de trabalho, você é um dos meus maiores exemplos de pessoa e profissional. Nunca deixou de dar bronca quando necessário, mas também nunca deixou de fazer um elogio.

Ao meu coorientador José Nélio por toda disponibilidade e orientação na parte científica dos projetos.

Ao meu amigo Felipe e toda a equipe da fazenda Santana pela parceria na execução dos projetos. Ao meu amigo Yuri Ganço e ao Prof. Júlio Jacob que colaboraram na execução dos experimentos com Doppler. A equipe da Fazenda Batista liderados pelo Sr. Edilson e Dra. Karen. Ao meu amigo Bruno que abraçou a ideia do projeto e viabilizou a execução do experimento no estado do Acre, também a sua família que nos recebeu no período do projeto.

Aos amigos de Pirassununga, foram só duas semanas de disciplina mas a amizade que fizemos foi forte! Aos amigos de Madison que ajudaram na reta final do mestrado, todas as discussões por mais de horas foram essenciais para dar corpo nos projetos, vocês foram brutos.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar o mestrado e também a CAPES pela bolsa que viabilizou esses anos de estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Mais uma vez agradecer à Deus por permitir que nessa caminhada além de adquirir conhecimento me levou ao encontro de sinceras amizades. Que seja sempre assim, por onde passe que leve a presença de Deus e mais amizades sejam iniciadas, isso tem sido minha maior conquista.

## RESUMO GERAL

ANDRADE, João Paulo Nascimento. **Inseminações sincronizadas com intervalo de 21 dias em novilhas Nelores não gestantes após diagnóstico precoce de gestação com ultrassonografia Doppler.** 2019. 41p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Dois experimentos foram realizados para desenvolver novas estratégias para resincronizar a ovulação de bovinos de corte. O primeiro foi realizado em Rio Branco-AC utilizando 300 novilhas Nelores. Após a primeira IATF, as novilhas foram distribuídas em dois programas de resincronização com inseminações em intervalos de 24 (PR-24) e 21 (PR-21) dias. Os tratamentos diferiram principalmente no momento de iniciar a resincronização e do diagnóstico de gestação (DG). No PR-24, o DG foi baseado na perfusão vascular do CL aos 22 dias pós IATF, sendo que fêmeas vazias receberam aplicação de análogo de PGF2 $\alpha$ , cipionato de estradiol, eCG e foram inseminadas no dia 24. No PR-21, o DG foi realizado com a mesma metodologia do PR-24, entretanto fêmeas consideradas vazias foram inseminadas imediatamente após o DG e receberam apenas gonadorelina. Novilhas do PR-21 apresentaram maior tamanho de folículo dominante do que as do PR-24, 10,9mm ( $\pm$ 1,9) vs. 10mm ( $\pm$ 2,1), respectivamente (P=0,0003), no entanto não houve diferença para taxa de ovulação (86,9% em PR-21 vs 86,8% em PR-24). A taxa de concepção (TC) da primeira IATF foi de 24,6%. As TCs das novilhas resincronizadas foram 33,6% e 29%, respectivamente, para PR-21 e PR-24 (P = 0,4). A TC da IATF realizada nas fêmeas que foram falso positivo no primeiro DG foi de 21,6% e as taxas de prenhez ao final da estação para PR-21 e PR-24 foram, respectivamente, 58,5% e 55,6%. Foi observada diferença entre TC das resynch PR-21 + PR-24 comparado a IATF (31% vs 24,6%; P=0,01). Foi observada diferença entre touros para concepção 59,2% vs. 24,8% (P=0,0001) e incidência de DG FP 6,5% vs 34% (P=0,01). O segundo experimento foi realizado em Valença-RJ utilizando 76 Novilhas Nelores, sendo que os tratamentos de resincronização foram os mesmos utilizados no PR-21. O objetivo foi comparar a eficiência de diferentes métodos de avaliação do corpo lúteo (perfusão vascular, tamanho e ecotextura) de forma objetiva e em escores subjetivos com diferentes avaliadores, como estratégia de DG precoce aos 21 dias pós IATF. Número de pixels coloridos, ecotextura/mm<sup>2</sup> e diâmetro apresentaram correlação de 0.65, 0.42 e 0.70, respectivamente, com o DG aos 33 dias (P<0,0001). Acurácia, sensibilidade e valor preditivo negativo (VPN) do diâmetro do CL foram similares a contagem de pixels coloridos. Não foi observada diferença entre avaliadores e todos apresentaram correlações similares dos escores com seus respectivos valores objetivos com alta significância nas correlações (P<0,0001). Somente escores de vascularização tiveram mesma eficiência que a avaliação objetiva, contudo, escores de tamanho e ecotextura juntos tiveram acurácia 88%, similar aos escores de vascularização 87.8%. As metodologias de escores subjetivos apresentaram eficiência similar pela análise na curva ROC (P=0,34). DG falso positivo foi de 22,7% e 19,2% (P=0,3), já o DG falso negativo foi 0% e 5,4% (P=0,0001), respectivamente, para DG no modo Doppler e modo B (ecotextura e tamanho). O PR-21 apresentou mesma eficiência que PR-24 e a ultrassonografia Doppler apresentou mesma eficiência quando usada de forma subjetiva, enquanto o tamanho do CL apresentou mesma eficiência que o Doppler somente avaliado de forma objetiva.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva, bovinos, ultrassom.

## GENERAL ABSTRACT

ANDRADE, João Paulo Nascimento. **Synchronized insemination with 21 days interval in open Nellore heifers post Doppler ultrasonography preg check.** 2019. 41p Dissertation (Masters in Veterinary Medicine, Clinical Science). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Two experiments were carried out to develop new strategies for resynchronization of ovulation in beef cattle. The first experiment was carried out in a commercial farm in Rio Branco-AC, using 300 Nellore heifers. After the first conventional TAI the heifers were distributed in two resynchronization programs with inseminations at intervals of 24 (PR-24) and 21 (PR-21) days. Treatments differed mainly at the time of resynchronization and at the time of the early preg check (PC) based in blood flow of the CL. In the PR-24, PC was at 22 days post TAI, non-pregnant heifers received an application of analog of PGF2 $\alpha$ , estradiol cypionate, eCG and were inseminated on day 24. In the PR-21, the PC was on day 21, non-pregnant heifers received gonadoreline and immediately after a new insemination was performed. Heifers of PR-21 had greater size of dominant follicle comparing with heifers of PR-24, 10.9mm ( $\pm$ 1.9) vs. 10mm ( $\pm$ 2.1), respectively (P=0.0003), but did not have difference in ovulation rate (86.9% PR-21 vs. 86.8% PR-24). The conception rate (CR) of the first TAI was 24.6%. The CR of resynchronized heifers was 33.6% and 29%, respectively, for PR-21 and PR-24 (P = 0.4). The CR of heifers that was false positive in the first PC was 21.6% and the pregnancy rates at the end of the breeding season for PR-21 and PR-24 were, respectively, 58.5% and 55.6%. There was a difference between resynch PR-21 + PR-24 CT compared to TAI (31% vs 24.6%; P = 0.01). It was observed a difference between bulls for conception 59.2% vs. 24.8% (P = 0.0001) and incidence of PC false positive 6.5% vs. 34% (P = 0.01). The second experiment was carried out in a commercial farm located in Valença-RJ with 76 Nellore heifers and the hormonal treatment was the same as were utilized in PR-21. The objective was to compare the efficacy of different methods of evaluation of the corpus luteum (vascular perfusion, size and ecotexture) in an objective way and in subjective scores with different evaluators, as a strategy of early PC at 21 days post TAI. Number of color pixels, ecotexture/mm<sup>2</sup> and diameter presented correlation of 0.65, 0.42 and 0.70, respectively, with the PC at 33 days (P<0.0001). Accuracy, sensitivity and negative predictive value (NPV) of CL diameter were similar to counting colored pixels. No difference was observed between the evaluators and all presented similar correlations of the scores with their respective objective values with high significance in the correlations (P <0.0001). Only vascularization scores had the same efficiency as the objective evaluation, however, size and echocardiographic scores together had an accuracy of 88%, similar to vascularization scores of 87.8%. The methodologies of subjective scores presented similar efficiency by the analysis in the ROC curve (P = 0.34). False positive PC was 22.7% and 19.2% (P = 0.3), while the false negative PC was 0% and 5.4% (P = 0.0001), respectively for PC in Doppler mode and B mode (echotexture + size). The PR-21 presented the same efficiency as PR-24 and Doppler ultrasound showed the same efficiency when used subjectively, while the CL size showed the same efficiency as the Doppler only objectively evaluated.

**Key words:** Reproductive efficiency, bovine, ultrasound.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Corpo Lúteo: Formação e Regressão</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Anestro</b> .....	<b>2</b>
<b>2.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Vacas de Corte</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4 Perdas Embrionária e Gestacionais</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4 Exame Ginecológico em Bovinos</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5 Ultrassonografia Doppler na Reprodução</b> .....	<b>6</b>
<b>2.6 Ressincronização</b> .....	<b>7</b>
<b>3. CAPÍTULO I</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	<b>12</b>
3.2.1 Local, período e animais .....	12
3.2.2 Sincronização da ovulação e IATF .....	12
3.2.3 Delineamento experimental.....	13
3.2.4 Exames ultrassonográficos em modo B e Doppler.....	13
3.2.5 Análise estatística .....	14
<b>3.3 Resultados</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4 Discussão</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5 Referências Bibliográficas</b> .....	<b>19</b>
<b>4. CAPÍTULO II</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Introdução</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	<b>25</b>
4.2.1 Local, período e animais .....	25
4.2.2 Sincronização da ovulação, IATF e ressincronizações.....	25
4.2.3 Diagnóstico de gestação modo-Doppler.....	26
4.2.4 Diagnóstico de gestação modo-B.....	26
4.2.5 Verificações de DG falso e diagnóstico de prenhez.....	27
4.2.6 Análise Objetiva de Pixels e Tamanho do CL.....	27
4.2.7 Validações dos escores subjetivos .....	27
4.2.8 Análise estatística .....	28
<b>4.3 Resultados</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4 Discussão</b> .....	<b>31</b>

<b>4.5 Referências .....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que no Brasil, atualmente, cerca de 19 milhões de vacas em idade reprodutiva ficam sem produzir um bezerro por ano, considerando uma ocupação de 1 vaca/ha podemos considerar que temos aproximadamente 19 milhões de hectares improdutivos. Dessa maneira o desempenho reprodutivo de vacas além de ser importante para economia do Brasil é um ponto de destaque na discussão de ocupação de terras. Biotécnicas reprodutivas como a IATF podem melhorar o desempenho de vacas de corte, pois aumenta a taxa de prenhez ao final da estação de monta. Apesar de aumentar a fertilidade das vacas de corte, a realização de somente uma IATF não é capaz de encurtar a estação de monta em cerca de dois meses com mais de 80% de vacas gestantes. O objetivo é ter uma janela de nascimento também com dois meses e assim aproveitar a estação com maior índice pluviométrico e dessa maneira aumentar o peso ao desmame das progênes.

Mais uma vez biotécnicas reprodutivas foram desenvolvidas sendo possível realizar uma estação de monta de cerca de dois meses somente com três IATFs. Essa estratégia além de encurtar a estação de monta, mais de uma sincronização na estação aumenta a taxa de prenhez ao final da estação pois possibilita que vacas em anestro que não responderam na primeira IATF ainda tenham mais uma indução da ovulação. O grande problema da estação de monta com 64 dias é que essa biotécnica não é capaz de ser replicada na seguinte estação (1 ano após), porque fêmeas que concebem na segunda ou terceira IATF, depois que parem, só se tornam aptas já com a estação iniciada. Um modelo ideal é de uma estação com 42 dias, pois vacas que concebem na primeira e segunda inseminação se tornam aptas para próxima estação antes dessa ter sido iniciada, apesar do último grupo de vacas ainda estar apta no início da estação ainda tem tempo suficiente para receber outras duas inseminações.

Um novo modelo com estação de monta em 48 dias vem sendo desenvolvido, mas este apresenta um manejo de difícil programação porque os dias dos tratamentos caem em dias aleatórios da semana dificultando sua aplicação em grandes lotes em uma mesma semana e eventualmente alguns manejos caem em finais de semana. Além disso, esse programa que vem sendo desenvolvido, é dependente da ultrassonografia Doppler para diagnóstico precoce de gestação e aparelhos equipados com essa avaliação geralmente são cerca de três vezes mais caros de aparelhos de ultrassom convencionais (modo B).

Assim sendo, a presente dissertação foi estruturada em dois capítulos que tratam do emprego da ultrassonografia Doppler e modo B no diagnóstico precoce da gestação em fêmeas Nelores, sendo apresentada da seguinte maneira: “Capítulo I – “Ressincronização da ovulação a cada 21 dias em novilhas Nelores”, onde foi desenvolvido um novo programa de ressincronização de ovulações para inseminações com intervalo de 21 em fêmeas Nelores e estação de monta em apenas 42 dias, sendo que essa perspectiva permitirá que os manejos sejam executados em um mesmo dia da semana. Adicionalmente, fixará a taxa de serviço em 100%, fazendo com que a taxa de prenhez seja igual à taxa de concepção. Já o “Capítulo II - Diagnóstico de gestação superprecoce aos 21 dias utilizando ultrassonografia modo Doppler ou B em novilhas Nelores” está relacionado com a eficiência de diferentes características do CL (perfusão vascular, diâmetro e ecotextura) aos 21 dias avaliados com ultrassom no modo Doppler ou B, como parâmetro para diagnóstico precoce de gestação em bovinos de corte.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Corpo Lúteo: Formação e Regressão

O corpo lúteo (CL) é uma glândula que controla de forma refinada o ciclo estral de fêmeas bovinas pela produção de progesterona (P4). A concentração de P4 controla a amplitude e os pulsos de LH/FSH, assim como elevadas concentrações de P4, associadas a altas concentrações de estradiol (E2), induzem a regressão de folículos em qualquer fase do ciclo e com isso induz a emergência de uma nova onda folicular sincronizada (ADAMS; MATTERI; GINTHER, 1992; BO et al., 1995; GIORDANO et al., 2012).

A fase que precede a formação do CL compreende um momento onde o estrógeno está em altas concentrações plasmáticas fazendo uma retroalimentação positiva no hipotálamo. Este *feedback* positivo provoca um pico de LH, culminando na ovulação (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Após a ovulação, a estrutura que era o folículo dominante inicia um processo de formação de uma nova estrutura dessa vez sólida e iniciando a produção de progesterona (THATCHER, 2017). A massa luteal continua aumentando juntamente com intenso processo de neovascularização que dura cerca de 7 dias, sendo essa fase descrita como metaestro conhecida pela formação e também fase onde o CL não é responsivo a luteólise exógena (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; GINTHER, 2007).

A partir disso, inicia-se a fase de diestro caracterizada pelo aumento na produção de progesterona e pela intensa vascularização do corpo lúteo. Avaliações da perfusão vascular do CL empregando a ultrassonografia Doppler mostraram alta correlação da vascularização com a produção de progesterona (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). No diestro, o CL passa a ser responsivo e a luteólise pode ser induzida de forma exógena. Estudos mostram que na fase do diestro uma única aplicação de análogos de prostaglandina 2  $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) decrescem a produção de progesterona em 1 hora, já perfusão vascular diminui em cerca de 5 a 6h e por último a área do CL começa a diminuir em 24h (GINTHER, 2007).

Estudos ainda procuram esclarecer eventos fisiológicos que determinam a regressão ou a manutenção do CL. Até o momento sabe-se que a concentração de estrógenos determina a expressão de receptores de estradiol (ESR) e receptores de ocitocina (OR) (AROSH; BANU; MCCRACKEN, 2016). Quando estes aumentam, permitem a ligação de estrógenos e ocitocina no útero e culminam com a produção de PGF2 $\alpha$  e através de um sistema de irrigação sanguínea de contracorrente conhecido como plexo venoso útero ovariano chega nos ovários (MCCRACKEN et al., 2012). A PGF2 $\alpha$  desencadeia um processo de produção de PGF2 $\alpha$  e ocitocina pelo próprio CL assim com 3 picos de PGF2 $\alpha$  levam a total regressão do CL diminuindo as concentrações plasmáticas de P4 abaixo de 1 ng/ml (AROSH; BANU; MCCRACKEN, 2016). Os picos de PGF2 $\alpha$  são verificados pela presença do seu metabolito 15keto-13,14-dihydro PGF2 (PGFM). Estudos mostraram que em novilhas não gestantes, 14 dias após a ovulação, 0,1ng de 17 $\beta$  estradiol estimula pico de PGFM superior ao necessário para luteólise, evidenciando a importância do estradiol no processo de regressão do CL (THATCHER, W. et al., 1986; PUGLIESI et al., 2012). Trabalhos utilizando antagonistas de OR no final da fase luteal, conseguiram impedir a luteólise nas fêmeas tratadas, dessa maneira foi observado o papel fundamental da expressão de receptores de ocitocina no processo regressão do CL (GRAZZINI et al., 1998).

### 2.2 Anestro

Um grande entrave no manejo reprodutivo de fêmeas de corte é o anestro (condição onde a fêmea não apresenta cio/ovulação), sendo que os principais momentos em que essa condição ocorre são no pós-parto e no início da puberdade. Wiltbank et al. (2002) citaram

como condições anovulatórias em bovinos: o crescimento folicular somente até a fase de emergência; crescimento folicular ultrapassando a fase de divergência; crescimento folicular até atingir diâmetro compatível com a ovulação ou mesmo superior (cistos foliculares); e condição anovulatória por persistência de tecido lúteo, sendo que a maioria desses problemas é causado por um menor número de pulsos de LH devido a fatores que inibem GnRH ou situações onde não houve um “acúmulo” de LH no hipotálamo.

O balanço energético negativo (BEN) é uma consequência fisiológica em que as fêmeas bovinas passam no momento do pós-parto, onde a glicose disponível diminui e as fêmeas utilizam de suas reservas corporais depositadas na forma de gordura para desviar seu metabolismo, dando prioridade para a produção de leite. Esse desvio metabólico energético causa um efeito inibitório para liberação de GnRH, fazendo com que persista essa condição de anestro (YAVAS; WALTON, 2000). Essa queima de reservas corporais guarda estreita relação com a fertilidade. Avaliando essa perda de forma subjetiva por escore de condição corporal (ECC), Ferreira et al. (2018) observaram que vacas Nelores no pós-parto com ECC acima de 3 (escala de 1 a 5) apresentaram maior probabilidade de engravidar no início da estação de monta e ainda terminaram a estação com prenhez acumulada superior que vacas com ECC abaixo de 2,75. Estudos mostraram que baixa condição corporal (ECC < 2,75) diminui a probabilidade da vaca apresentar um corpo lúteo no início da estação, evidenciando o impacto do ECC na manutenção da condição de anestro (AYRES et al., 2014).

Outro fator que pode causar um descontrole no eixo reprodutivo hormonal é o “efeito da mamada”, já que a presença do bezerro reduz a liberação de GnRH (WILLIAMS, 1990). Esse efeito se faz pela secreção de um peptídeo opióide hipotalâmico ( $\beta$ -endorfina) em resposta ao estímulo da amamentação, da visão e do olfato do bezerro pela mãe. Separar o bezerro da vaca no sentido de diminuir o período de contato diário (remoção do bezerro durante 48 a 96h) atenua os efeitos negativos deste vínculo maternal na secreção de LH, que aumenta sua pulsatilidade (MONTIEL et al., 2005). Dessa maneira, pode-se concluir que essa relação é responsável por prolongar o anestro pós-parto que, associado ao BEN e ao baixo ECC, podem fazer com que as vacas retornem à ciclicidade em períodos superiores a 100 dias pós-parto.

Os efeitos negativos citados acima podem ser contornados com a utilização de progestágenos associados à gonadotrofina coriônica equina (eCG), sendo esse último produzido no cálice endometrial de éguas gestantes atuando principalmente em receptores de FSH. A utilização da eCG de forma estratégica promove um suporte gonadotrófico à capacidade ovulatória de um folículo (SALES et al., 2011). Baruselli et al. (2004) avaliaram o efeito da eCG em fêmeas Nelores com diferentes ECC e houve interação entre eCG e ECC. Vacas com piores ECC (menor ou igual a 3,0) apresentaram melhores taxas de prenhez quando a eCG foi utilizada [sem eCG – 22,7%, 42,8%, 53,9%, 52,1% e 69,6% vs. com eCG – 47,6%, 56,9%, 58,4%, 51,7% e 63,8%, respectivamente para os ECC 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0].

No caso de novilhas, um aspecto importante para o início da ciclicidade é a condição alimentar e a disponibilidade de forragens. Avaliando 617 novilhas entre 2 e 3 anos, foi observada alta correlação entre peso, escore de condição corporal e ciclicidade. Quanto maior o peso e escore, menor era a proporção de novilhas que ainda estavam pré-púberes (SANTOS et al., 2006). Sá Filho et al. (2008) definiram como puberdade uma primeira ovulação fértil seguida de uma fase luteal com duração normal. Novilhas, geralmente na primeira ovulação, apresentam uma fase luteal curta, sendo necessários dois a três ciclos estrais normais para que a novilha adquira maturidade sexual e apresente capacidade de conceber e levar a gestação a termo (BYERLEY et al., 1987). Entretanto, segundo Santos et al. (2006) e Sá Filho et al. (2008), apenas 50% de novilhas com 300kg de peso vivo estarão cíclicas no primeiro dia da estação de monta. Como observado, mesmo com o manejo nutricional correto para que o

animal apresente 55% a 60% do peso adulto no início da estação de monta, por volta de apenas 50% dos animais estarão cíclicos.

Nesse sentido, a IATF pode induzir a ciclicidade tanto em vacas como novilhas sendo possível inseminar fêmeas que estavam em condição de anestro (SÁ FILHO et al., 2008). Crepaldi et al. (2017) observaram que fêmeas que receberam mais de uma IATF na estação de monta (EM) apresentaram taxa de prenhez superior a fêmeas que receberam apenas uma IATF na EM. Os mesmos autores citados apresentaram uma proposta de EM de 64 dias somente com IA fechando a estação com taxa de prenhez com acima de 80%.

### **2.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Vacas de Corte**

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva de grande importância e com impacto nos sistemas pecuários, visto que possibilita a utilização de material genético de machos com alta DEP (diferenças esperadas na progênie) pela criopreservação do sêmen, possibilitando o acasalamento de indivíduos geograficamente distantes. Ferreira (2016) destacou um aumento no peso ao desmame acima de 7 Kg para bezerro filhos de IA comparado com bezerros filhos de touro por monta natural (MN). Para realização de IA convencional em fêmeas bovinas se faz necessária a detecção de estro, o que causa dificuldades operacionais para aplicação desta biotécnica em grande escala na pecuária de corte.

Nos anos 90 foi desenvolvida uma nova proposta para programas de IA em bovinos. Com a aplicação exógena de GnRH, foi possível induzir a emergência de uma onda folicular em cerca de 3 dias, devido a indução da ovulação de um folículo dominante. Sete dias após o GnRH, foi aplicado PGF2 $\alpha$  e por fim mais uma dose de GnRH 48h após a PGF2. Dessa maneira, foi possível inseminar um lote de vacas em um mesmo momento sem a necessidade de detecção de estro (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Entretanto, para que esse tratamento seja eficiente, se faz necessário que as fêmeas tenham um folículo responsivo à indução da ovulação no início do tratamento hormonal.

Em países onde o uso de estrógenos é permitido, pesquisadores associaram progesterona com benzoato de estradiol promovendo um bloqueio na liberação de gonadotrofinas, assim foi possível induzir a emergência de uma nova onda folicular com mais eficiência comparado a uma única aplicação de GnRH. Os primeiros tratamentos propostos consistiam na aplicação de benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg; i.m.) no momento da inserção de um dispositivo/implante de P4 (Dia 0), aplicação de PGF2 $\alpha$  no momento da retirada do dispositivo/implante (Dia 8 ou 9) e aplicação de 1,0 mg de BE 24 horas após, sendo a IATF realizada 30 a 36 horas após o BE e 54 a 60 horas após a retirada dos dispositivos (VASCONCELOS; PURSLEY; WILTBANK, 1994; BO et al., 1995).

Com intuito de reduzir o número de manejos, foi testada a substituição de ésteres de estradiol utilizados na indução da ovulação por um éster de meia vida mais longa. Assim, foi avaliado o uso de cipionato de estradiol (CE; 1,0 mg; i.m.) no momento da retirada do dispositivo e a IATF foi realizada também de 54 a 60 horas após a retirada dos dispositivos. Não foi observada diferença nas concepções utilizando diferentes ésteres de estradiol na indução da ovulação, logo foi possível realizar a IATF em fêmeas de corte com apenas 3 manejos (SALES et al., 2012; BARUSELLI, et al., 2017).

### **2.4 Perdas Embrionárias e Gestacionais**

Fêmeas bovinas apresentam taxa de fertilização acima de 90% mas, após esse período, os animais passam por fases cruciais para o estabelecimento e para a manutenção da gestação (DISKIN et al., 2016; WILTBANK, M. C. et al., 2016). Apesar disso, vacas leiteiras de alta

produção e sob estresse térmico apresentam taxa de fertilização de cerca de 55%, mas quando avaliadas em condições térmicas favoráveis ou não estando lactantes, a taxa de fertilização é de 87,8 e 89,5%, respectivamente (SARTORI et al., 2002).

Logo após a fertilização, a morte embrionária é o período com maior impacto negativo para estabelecimento da gestação, especificamente entre os dias 8 e 18 pós-inseminação (DUNNE; DISKIN; SREENAN, 2000). Até 28 dias de gestação, as perdas gestacionais são em torno de 30%, mas relatos encontrados na literatura mostram perdas que variam de 30% a 41% mostrando uma grande variação entre rebanhos diferentes (WILTBANK et al., 2016). No período de 8 a 28 dias de gestação é crucial as concentrações plasmáticas de progesterona para estabelecimento e manutenção da gestação visto que envolve o alongamento embrionário e início do mecanismo de sinalização para reconhecimento da gestação (SPENCER; HANSEN, 2015; WILTBANK, et al., 2016).

No segundo mês de gestação, as perdas gestacionais são cerca de 12%, onde problemas no desenvolvimento placentário pode levar a regressão do CL. Por fim, a partir desse período, as perdas são estimadas em cerca de 2% comparados aos outros períodos onde os problemas aqui envolvidos são a incidência de gestação gemelar e infecções bacterianas (CHATE, 2009; WILTBANK et al., 2016b; WILTBANK et al., 2016). As causas para perdas embrionárias e gestacionais são multifatoriais: genéticas, estresse ambiental, doenças reprodutivas e também balanço energético de dietas no pós-parto (DISKIN et al., 2016).

O aumento de progesterona pós IA vem sendo estudado como estratégia para aumentar a concepção e também diminuir perdas gestacionais, a suplementação pode ser feita através da indução de um CL acessório 5 a 7 pós IA ou simplesmente pela aplicação de progesterona exógena de longa ação (COUTO et al., 2019; NILES et al., 2019).

## **2.4 Exame Ginecológico em Bovinos**

A avaliação do trato reprodutivo de vacas por palpação retal é descrita desde 1800 como método de diagnóstico de gestação. Wisnicky e Cassida em 1948 descreveram a técnica de diagnóstico de gestação pela palpação da vesícula amniótica (FRICKE et al., 2016). A palpação retal também pode ser utilizada para avaliar a presença ou ausência de CL e folículos antrais nos ovários. E ainda essa técnica também já foi utilizada como método de sincronização de estros pela nucleação digital do CL (remoção mecânica do CL) (BARNABE; MUCCILO; BARNABE, 1976).

Já era um grande avanço tecnológico a possibilidade de diagnosticar fêmeas gestantes e ainda sincronizar o estro em fêmeas bovinas, mas pesquisadores mostraram que o uso exclusivo de palpação retal para avaliação ginecológica acarretava consequências negativas para o trato reprodutivo. Estudos mostraram que o diagnóstico de gestação por palpação retal aumentava o risco de perda gestacional e o uso da remoção mecânica do CL por palpação poderia aumentar a incidência de fibrose e aderência nos ovários (BARNABE; MUCCILO; BARNABE, 1976; FRICKE, et al., 2016).

A ultrassonografia modo B difundiu-se em sistemas comerciais e de pesquisa por volta dos anos 2000 (FRICKE, , 2002). A avaliação refinada de estruturas ovarianas permitiu o conhecimento do padrão de ondas foliculares, de diferentes tipos de desvio de crescimento do folículo dominante assim como a detecção de patologias uterinas e ovarianas (GINTHER, 1998; GOMEZ-LEÓN et al., 2019). A visualização do conceito de forma objetiva permitiu um diagnóstico de gestação com alta acurácia por volta dos 30 dias de gestação assim como a sexagem fetal aos dois meses de gestação (GINTHER, 1998). Em condições de estudos foi possível realizar o diagnóstico de gestação ainda mais cedo, aos 21 dias, pela correlação entre líquido uterino, presença do CL e visualização do conceito com acurácia acima de 90%, mas em situações comerciais, o DG abaixo de 28 dias pós IA teve sua eficiência diminuída

(KASTELIC; CURRAN; GINTHER, 1989; KASTELIC; BERGFELT; GINTHER, 1991; FRICKE et al., 2016).

A possibilidade de realizar um diagnóstico de gestação preciso por volta dos 30 dias possibilitou o desenvolvimento de programas de ressincronização da ovulação, permitindo encurtar o intervalo entre IATFs para 32 dias em vacas de corte e também aumentar a taxa de prenhez de vacas leiteiras (CHEBEL et al., 2003; BARTOLOME et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2014). Antes mesmo da IA, a avaliação do tamanho do folículo e a espessura endometrial avaliada com o auxílio do ultrassom podem prever a fertilidade das fêmeas (BAEZ et al., 2016; MOROTTI et al., 2018; SUGIURA et al., 2018).

Atualmente, pesquisadores buscam padronizar uma triagem ginecológica com ultrassom, previamente à sincronização, ou antes, do momento da IATF considerando tamanho e presença de folículos ou CL como possibilidade de incrementar o desempenho reprodutivo ou como estratégia de minimizar custos nos programas de IATF (GRILLO et al., 2015; FERREIRA, 2016).

## **2.5 Ultrassonografia Doppler na Reprodução**

O princípio do efeito Doppler é obtido por uma mudança no sentido do retorno da onda sonora emitida pelo transdutor, quando se encontra com um objeto em movimento, sendo que essa mudança pode ser negativa ou positiva. Caso a onda se choque com fluxo celular em sentido contrário de sua emissão, acelera-se o retorno da onda refletida ao transdutor, e se o sentido for o mesmo da emissão, gera um atraso na onda refletida, resultando em um deslocamento de frequência Doppler ou “Doppler Shift” (SZATMÁRI et al., 2001). No monitor, esse efeito é mostrado com diferentes cores (Color-Doppler) ou diferentes intensidades de cores (Power-Doppler) (GINTHER, 2007). Devido à movimentação das células vermelhas do sangue, essa ferramenta apresenta um grande potencial de avaliar diferenças no fluxo sanguíneo de tecidos (PUGLIESI et al., 2017).

Essa ferramenta abriu um potencial para estudo relacionado à funcionalidade de órgãos reprodutivos baseado em eventos com alterações no padrão vascular, seja por neovascularização ou por aumento da perfusão vascular de tecidos (GINTHER, 2007; PUGLIESI et al., 2017). Uma série de estudos foi desenvolvido caracterizando eventos fisiológicos em vacas e éguas, e a avaliação da perfusão vascular permitiu mostrar o momento do desvio do folículo dominante antes de haver diferença pelo diâmetro do folículo dominante em comparação aos subordinados (GINTHER, 2007; GINTHER et al., 2014).

Estudos revelaram que a maior perfusão vascular na parede do folículo pré-ovulatório em novilhas apresentou relação positiva com fertilização e com o desenvolvimento embrionário *in vitro*, assim como uma relação positiva entre a extensão do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e o sucesso no estabelecimento da gestação em vacas (SIDDIQUI et al., 2009a; SIDDIQUI et al., 2009b).

A perfusão vascular do folículo dominante foi correlacionada com o pico de LH e esta avaliação pode prever o momento da ovulação em fêmeas sincronizadas. Em contraste, o folículo anovulatório não apresenta perfusão vascular detectável com o Doppler (ACOSTA et al., 2003; ACOSTA, 2007; GINTHER, 2007). Baixa perfusão vascular aumenta a fosforilação oxidativa mitocondrial, logo a avaliação da perfusão vascular pode ser correlacionada com a qualidade dos CCOs (Complexo Cumulus-Oócito), que indica uma maior taxa de blastocisto em programas *in vitro* e uma maior taxa de prenhez em programas *in vivo* (PANCARCI et al., 2012).

As peculiaridades vasculares do CL também foram estudadas com a ferramenta Doppler. Foi observada alta correlação entre a perfusão vascular do CL e concentração plasmática de progesterona no diestro de fêmeas bovinas. Também foi acompanhada a luteólise natural onde o decréscimo da perfusão vascular diminuiu junto com a concentração

plasmática de progesterona (SHIRASUNA et al., 2004; LÜTTGENAU et al., 2011). Em vacas, após a aplicação de uma dose de PGF2 $\alpha$  no diestro, a concentração plasmática de P4 cai em 1h e a porcentagem de área vascular apresenta um decréscimo a partir de 2h após a aplicação de PFG2 $\alpha$  (GINTHER, 2007). A partir dos conhecimentos de alterações fisiológicas relacionadas a processos dinâmicos de vascularização no CL durante o ciclo estral, foi possível realizar diagnóstico de gestação precoce entre 19 e 22 dias em vacas, utilizando como referência a perfusão vascular do CL (UTT et al., 2009; PUGLIESI et al., 2014).

A utilização da ultrassonografia Doppler apresenta uma perspectiva potencial a ser incrementada nos programas reprodutivos comerciais. Recentes trabalhos mostraram que a avaliação com ultrassom Doppler é possível de ser aplicada em grande escala, proporcionando uma diminuição considerável para 24 dias no intervalo entre IATFs e TETFs (transferência de embrião em tempo fixo) devido a um diagnóstico precoce pela perfusão vascular do CL. Essa ferramenta também foi utilizada como padrão de avaliação de receptoras no momento da TE sendo possível prever animais com melhor receptividade e também descartar receptoras com CL não funcional (GUIMARÃES et al., 2015; PINAFFI et al., 2015; PENTEADO et al., 2016; PUGLIESI et al., 2017; PUGLIESI et al., 2018).

## **2.6 Ressincronização**

No início dos anos 2000, Chebel et al. (2003) destacaram a importância de reduzir o intervalo entre serviços de fêmeas bovinas e, para isso, propuseram uma ressincronização das ovulações. Após 21 dias da inseminação e antes mesmo do diagnóstico de gestação, foi aplicada uma dose GnRH, com intuito de induzir a emergência de uma nova onda folicular. Dessa maneira, no dia 28 após a última IA, os animais que não tivessem concebido continuavam no tratamento e a IA era realizada 30 dias após a primeira IA nas vazias. Outros pesquisadores também testaram uma variação do protocolo de “Ovsynch” na ressincronização (STEVENSON et al., 2003).

Cavalieri et al. (2007) utilizaram benzoato de estradiol (BE) 23 dias após a IATF juntamente com a colocação de um dispositivo intravaginal para induzir a emergência da onda. Esses autores relataram uma concepção satisfatória na segunda IATF. Entretanto, especulava-se uma possível interferência da aplicação de BE na manutenção das gestações nas vacas que viessem a ficar gestantes da primeira IA, devido a um estímulo de liberação de PGF2 $\alpha$  pelo aumento de estrógeno (MUNRO; MOORE, 1985).

Uma década após os primeiros trabalhos de ressincronização, Sá Filho et al. (2014) trouxeram à luz dúvidas entre esses métodos de Resynch utilizados, estudando a indução da emergência da onda aos 22 dias após a IATF com GnRH ou BE, ambos em associação com dispositivos intravaginais de progesterona. Os autores observaram um acréscimo na concepção das Resynchs para as fêmeas que tiveram a indução realizada com BE, e ainda os autores concluíram que, assim como o GnRH, uma aplicação de BE aos 22 dias após a primeira IATF não compromete a concepção do primeiro serviço. Pessoa et al. (2015) avaliaram a resposta de diferentes doses de BE (1 vs 2mg) em animais ressincronizados aos 22 dias e em um total de 1.426 fêmeas estudadas. Os autores não observaram diferenças nos grupos para perdas gestacionais nos diagnósticos entre 30 e 60 dias (3,8% e 5,5%, respectivamente, para 1 e 2mg de BE aplicados no dia 22 pós IATF). Quando avaliaram a concepção do segundo serviço (47,3% vs. 36,1%, respectivamente para 2 e 1mg) e a prenhez acumulada com dois serviços (68,2% vs. 62,8%, respectivamente para 2 e 1mg), os autores encontraram superioridade significativa para as fêmeas tratadas com 2mg.

Recentemente, Penteado et al. (2016) desenvolveram um método superprecoce de ressincronização, 14 dias após o último serviço. Os pesquisadores colocaram um novo dispositivo intravaginal de progesterona mais a aplicação de progesterona injetável. Oito dias

após, o dispositivo foi removido e foi realizado o diagnóstico de gestação através da avaliação subjetiva do escore de perfusão vascular do CL. Os animais considerados não gestantes, receberam um análogo de prostaglandina 2 $\alpha$ , cipionato de estradiol e eCG e a IATF foi realizada dois dias após o diagnóstico de gestação Doppler e aos 24 dias da última IATF. Os autores relataram concepção acumulada acima de 70% com apenas 2 serviços. Com essa estratégia, foi possível fixar a taxa de serviço em 87% durante a estação de monta. Entretanto, esse programa reprodutivo mais intensivo obrigatoriamente faz com que alguns dias de manjo caiam em finais de semana, logo, essa estratégia não se aplica a qualquer propriedade comercial devido à disponibilidade de mão de obra ser um fator individual.

### 3. CAPÍTULO I

Artigo em preparação para ser submetido à revista Theriogenology

## **RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO A CADA 21 DIAS EM NOVILHAS NELORES**

J.P.N. Andrade<sup>a</sup>, F. Sonnewend<sup>a,d</sup>, B.P. Carvalho<sup>b</sup>, K.L. Lacouth<sup>c</sup>, V.E. Gomez-León<sup>d</sup>, J.C.F. Jacob<sup>a</sup>, M.C. Wiltbank<sup>d</sup>, J.N. Sales<sup>e</sup>, M.R.B. Mello<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brasil

<sup>b</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Rio Branco, Acre 69900-970, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Produção Animal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre 69915-900, Brasil

<sup>d</sup> Department of Dairy Science, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin 53706, USA

<sup>e</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brasil

\* Correspondência do autor: Marco R. B. Mello; Tel.: +55 (21) 981721892.  
E-mail: mmrural@gmail.com

## RESSINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO A CADA 21 DIAS EM NOVILHAS NELORES

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um programa de ressinchronização (Resynch) com inseminações a cada 21 dias. No estudo, 300 novilhas Nelores com peso médio de 291,5 ( $\pm$  33,5) kg foram sincronizadas para IATF, sendo o dia da inseminação considerado D0. Após a primeira IATF, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois programas de ressinchronização: Resynch24 (inseminações com intervalo de 24 dias) e Resynch21 (inseminações com intervalo de 21 dias). No grupo Resynch24, 14 dias após a IATF, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (Cronipres® Monodose M-24 Biogénesis Bagó, Brasil) e 50mg de progesterona injetável im (Sincrogest LA®, OuroFino, Brasil). No D22, o dispositivo de P4 foi removido e realizou-se o diagnóstico precoce de gestação (DGDoppler) por ultrassonografia Doppler (Z5VET, Mindray, China). Nesse momento, as fêmeas não gestantes receberam 150 $\mu$ g de cloprostenol (Croniben® Biogénesis Bagó, Brasil), 0,5mg de cipionato de estradiol (Croni-Cip® Biogénesis Bagó, Brasil) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Ecegon® Biogénesis Bagó, Brasil) e foram inseminadas 48 horas depois (D24). No grupo Resynch21, 12 dias após a IATF, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal de P4. No D19, o dispositivo de P4 foi removido e foram administrados 300UI de eCG. O DG Doppler foi realizado no D21, sendo que as fêmeas consideradas vazias receberam a aplicação (im) de 0,1mg de gonadorelina (Fertagyl® MSD, Saúde Animal, Brasil) e foram inseminadas imediatamente. Em ambos os grupos foram realizadas duas ressinchronizações. Exames ultrassonográficos foram realizados para verificar o tamanho do folículo dominante no dia da IA (FD) e também para avaliar taxa de ovulação (TO) e de falso positivos (DGFP) na 2ª e 3ª Resynchs avaliados respectivamente aos 12 e 11 dias após a IA para grupo Resynch21 e aos 14 e 11 dias após IA para Resynch24. O DG final foi realizado 40 dias após a segunda ressinchronização. A análise estatística foi realizada pelo programa SAS. A taxa de ovulação (Resynch21 - 86,9% e Resynch24 - 86,8%) e a porcentagem de DGFP (Resynch21 - 27,6% e Resynch24 32,9%) foram semelhantes entre os programas de ressinchronização. No entanto, o diâmetro folicular no momento da IATF foi maior nas novilhas do grupo Resynch21 (10,9 $\pm$ 1,9mm vs. 10  $\pm$ 2,1 mm; P=0,0003). Na IATF1, foi observada uma tendência (P=0.074) da concepção das novilhas do Resynch21 (29.3%) ser maior do que a das novilhas da Resynch24 (20.3%). As taxas de concepção e de prenhez ao final da estação foram semelhantes entre os programas de ressinchronização (Resynch21 - 33,6% e Resynch24 - 29% e Resynch21 - 58,5% e Resynch24 - 55,6%, respectivamente). Conclui-se que ressinchronização da ovulação a cada 21 dias apresenta mesma eficiência que a ressinchronização com intervalo de 24 dias.

**Palavras-chave:** Reprodução, eficiência reprodutiva, bovinos, *bos taurus indicus*.

## OVULATION RESYNCHRONIZATION EVERY 21 DAYS IN NELLORE HEIFERS

### ABSTRACT

The main objective of this study was to develop a resynchronization program (Resynch) with inseminations every 21 days. A total of 300 Nellore heifers weighting  $291.5 \pm 33.5$  Kg were used on the current experiment. The heifers were synchronized for a first fixed time artificial insemination (FTAI-1) and the insemination day was considered as D0. Subsequently, the heifers were equally randomized into two different programs: A Resynch24 (24 days insemination interval) and a Resynch21 (21 days insemination interval). Heifers in the Resynch24 received on D14, an intravaginal progesterone device (Cronipres® Monodose M-24 Biogenesis Bagó, Brazil) and an im dose of progesterone (50 mg; Sincrogest LA®, OuroFino, Brazil). On D22, the P4 device was withdrawn and a pregnancy check (PC-Doppler) was performed by Doppler ultrasonography (Z5VET, Mindray, China). At this time, the non-pregnant heifers received 150 µg of D-cloprostenol (Croniben® Biogenesis Bagó, Brazil), 0.5 mg of Estradiol Cypionate (Croni-Cip® Biogenesis Bagó, Brazil) and 300 UI of equine Chorionic Gonadotropin (Ecegon® Biogenesis Bagó, Brazil) with subsequent insemination 48 hours later (D24). Heifers in the Resynch21 received on D12, an intravaginal P4 device (1 g) that was withdrawn on D19 along with the im administration of 300UI of eCG. The PC-Doppler was performed on D21; on this day, the non-pregnant heifers were inseminated and received 0.1 mg of gonadorelin (im; Fertagyl® MSD, Animal Health, Brazil). In both groups, two resynchronizations were performed. Ultrasound exams were performed to verify the size of the dominant follicle on day of insemination as well as the ovulation rate. The incidence of false positive pregnancies was evaluated 12 and 11 days after insemination for the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> Resynch21 and on days 14 and 11 after insemination for the Resynch24. The final pregnancy check was performed 40 days after the last insemination. Statistical analysis was performed by using the GLIMMIX procedure of the SAS program. The ovulation rate (Resynch21 - 86.9% and Resynch24 - 86.8%) as well as the incidence of false positive pregnancies (Resynch21 - 27.6% and Resynch24 32.9%) were similar between the resynchronization programs. However, the follicular diameter at the time of FTAI was larger in the Resynch21 heifers ( $10.9 \pm 1.9$  mm vs.  $10 \pm 2.1$  mm;  $P = 0.0003$ ). It was observed a trend ( $P = 0.074$ ) for greater conception rate of Resynch21 heifers 29.3% when compared to Resynch24 heifers 20.3% during the FTAI-1. Conception and pregnancy rates at the end of the breeding season were similar between the two resynchronization programs (Resynch21 - 33.6% and Resynch24 - 29% and Resynch21 - 58.5% and Resynch24 - 55.6% respectively). It was concluded that Resynch21 and Resynch24 (ovulation synchronization every 21 or 24 days) has similar satisfactory reproductive efficiency.

**Key-words:** Reproduction, reproductive efficiency, bovine, *bos taurus indicus*.

### 3.1. Introdução

Em 1995, Pursley e Wiltbank [1] propuseram o uso da inseminação artificial sem a necessidade de observação de cio, sendo as vacas inseminadas em tempo pré-determinado (IATF) devido a sincronização da emergência da onda folicular e ovulação utilizando o GnRH. A partir desse primeiro protocolo de sincronização, surgiram outros que utilizavam a associação de progesterona e estradiol para promover a sincronização da ovulação. Atualmente, tais protocolos estão bem estabelecidos e amplamente utilizados em bovinos de corte e de leite [2].

Após o estabelecimento dos protocolos de IATF, iniciou-se programas para intensificar o uso da IATF por sucessivas sincronizações, diminuindo cada vez mais o intervalo entre serviços, de 42 para 24 dias (ressincronização superprecoce), alcançando taxa de serviço a cada 21 dias de 87% [3-11]. Essas estratégias aumentam a eficiência reprodutiva por diminuir o intervalo de partos [9, 12]. Entretanto, programas intensivos (ressincronizações) são mais complexos na logística, requerem o uso de mais hormônios e os manejos não são executados obrigatoriamente em dias fixos da semana. Desta forma, simplificações na execução da técnica podem aumentar o número de vacas inseminadas no mundo [13, 14]. Em programas de ressincronização superprecoce é necessário o uso da ultrassonografia Doppler para realização do diagnóstico de gestação pela perfusão vascular do corpo lúteo (CL) entre 20 e 22 dias pós IA. No entanto, esse diagnóstico apresenta menor acurácia comparado ao diagnóstico 30 dias após inseminação, levando a detecção de falsos positivos (DG-FP) [15, 16].

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de um programa de ressincronização de ovulações com intervalo de 21 dias em novilhas Nelores. A hipótese levantada foi de que a ressincronização a cada 21 dias em novilhas *Bos taurus indicus* possui semelhantes taxas de falsos positivos, de ovulação e de prenhez comparada aos programas com intervalo a cada 24 dias.

### 3.2. Material e Métodos

#### 3.2.1 Local, período e animais

O presente trabalho foi realizado na Fazenda Batista localizada na região norte do Brasil no município de Rio Branco – Acre, entre junho e setembro de 2018. No estudo foram utilizadas 300 fêmeas nulas da raça Nelore com peso médio de  $291,6 \pm 1,9$  kg e idade aproximada de 24 meses. As novilhas foram mantidas em pastagem de capim-mombaça, na qual tinham acesso livre a água e ao suplemento mineral. Todos os animais foram submetidos previamente à avaliação ginecológica por palpação retal e ultrassonografia, sendo descartadas novilhas gestantes ou com alterações no trato reprodutivo (cisto folicular, infecção uterina, cérvix tortuosa ou fibrosada). O presente estudo teve a aprovação do comitê de ética na pesquisa do Instituto de Veterinária da UFRRJ, protocolada sob o CEUA nº 1730040918.

#### 3.2.2 Sincronização da ovulação e IATF

O tratamento hormonal para realização da IATF iniciou-se com a administração intramuscular (im) de 2,0mg de benzoato de estradiol (BE) (Bioestrogen® Biogénesis Bagó, Brasil) e inserção de dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Cronipres® Monodose M-24 Biogénesis Bagó, Brasil) em dia aleatório do ciclo estral considerado dia menos 10 (D-10). No D-2, o dispositivo de progesterona foi retirado e administrado-se 150µg de cloprostenol sódico (PGF; Croniben® Biogénesis Bagó, Brasil), 0,5mg de cipionato de

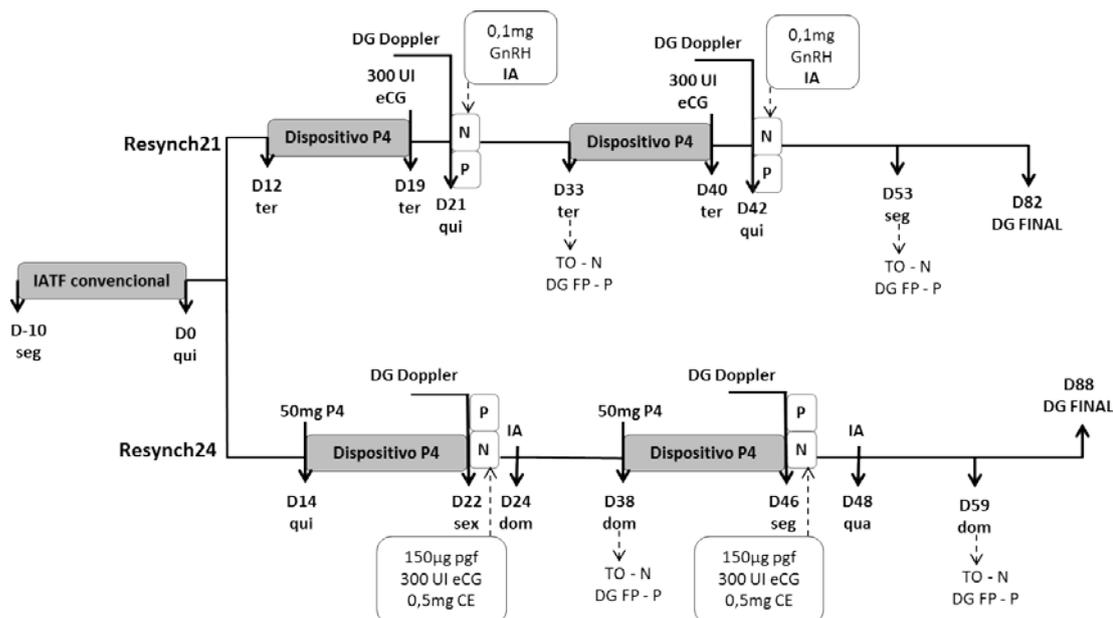
estradiol (CE; Croni-Cip® Biogénesis Bagó, Brasil) e 300UI de eCG (Ecegon® Biogénesis Bagó, Brasil). A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo de P4 (D0) por um único inseminador utilizando sêmen de dois touros, sendo utilizada apenas as partidas que apresentassem no mínimo 35% de motilidade espermática progressiva e um máximo de 20% de células anormais totais pós-descongelamento. Foi utilizado sêmen de dois touros diferentes para todas as inseminações da estação onde 74% das inseminações foram do Touro 1 e 26% do Touro 2. Na primeira IATF assim como nas sucessivas ressincronizações, essa proporção dos touros utilizados foi mantida entre os dois tratamentos (programas de ressincronização).

### **3.2.3 Delineamento experimental**

Após a primeira IATF (IATF1), as novilhas foram distribuídas de acordo com o peso em dois programas de ressincronização (Resynch21 e Resynch24), de forma que os grupos tivessem animais com peso semelhante. No Resynch21, as inseminações foram realizadas em intervalos de 21 dias e no grupo Resynch24, as inseminações foram realizadas em intervalos de 24 dias (Figura 1). No grupo Resynch21, doze dias (D12) após a IATF, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona. No D19, o dispositivo foi removido e foram administradas 300UI de eCG. O diagnóstico de gestação por Doppler (DG Doppler) foi realizado no D21, sendo que as fêmeas consideradas vazias, receberam a administração im de 0,1mg de gonadorelina (Fertagyl® MSD, Saúde Animal, Brasil) e foram inseminadas imediatamente após o DG. Uma réplica desse tratamento foi realizada após a 2ª IATF finalizando a EM com 42 dias. As novilhas do Resynch21, após a primeira IATF convencional, não receberam análogos de prostaglandina 2 $\alpha$  nem ésteres de estradiol na sincronização das ovulações. No grupo Resynch24, quatorze dias (D14) após a primeira IATF, as novilhas receberam novamente a inserção de um dispositivo intravaginal e administração im de 50mg de progesterona injetável de longa ação (Sincrogest LA®, OuroFino, Brasil). No D22, o dispositivo foi removido e realizou-se o diagnóstico de gestação por Doppler. As novilhas consideradas vazias receberam a administração de 150 $\mu$ g de cloprostenol, 0,5mg de CE e 300UI de eCG e inseminadas 48 horas depois (D24). Uma réplica desse mesmo tratamento foi realizada após a 2ª IATF finalizando a estação de monta (EM) com 48 dias.

### **3.2.4 Exames ultrassonográficos em modo B e Doppler**

O diagnóstico de gestação precoce foi realizado com auxílio de ultrassom Doppler Mindray, modelo Z5VET, equipado com transdutor linear 75L50EAV e emissão de onda de 5,0/7,5 MHz padronizando o ganho total de 70%. A metodologia de diagnóstico de gestação foi realizada de acordo com Pugliesi et al. [17] Foram realizados exames ultrassonográficos (DP-2200 Vet, probe linear de 5MHz) para avaliar o diâmetro folicular no momento da IATF, a taxa de ovulação da 1º Resynch e a confirmação do 1º DG Doppler (no dia da inserção do dispositivo intravaginal para a 2ª Resynch, sendo D33 para o Resynch21 e D38 para o Resynch24), a taxa de ovulação da 2º Resynch e a confirmação do 2º DG Doppler (11 dias após a última IA sendo D53 para o grupo PR-21 e D59 para o PR-24). Foi considerada gestante a novilha que apresentasse vesícula embrionária. Os animais que tiveram DG-FP (diagnóstico de gestação falso positivo) no 1º DG Doppler foram sincronizados como descrito na 1ª IATF. O DG final foi realizado 40 dias após a última IATF.



**Figura 1.** Ilustração dos programas de Resynch: (Dispositivo P4) dispositivo intravaginal monodose de progesterona; (BE) benzoato de estradiol; (CE) cipionato de estradiol; (eCG) gonadotrofina coriônica equina; (PGF) cloprostenol sódico; (50mg P4) progesterona injetável de longa ação; (GnRH) gonadorelina; (DG Doppler) diagnóstico de gestação Doppler; (DG Final) diagnóstico de gestação ao final da estação de monta; (TO) taxa de ovulação; (P) diagnóstico positivo; (N) diagnóstico negativo; (DG FP) verificação de diagnósticos falsos.

### 3.2.5 Análise estatística

As variáveis binomiais, diagnóstico falso positivo (DG-FP), taxa de prenhez final, taxa de concepção e taxa de ovulação foram avaliadas utilizando o procedimento GLIMMIX do programa SAS (Version 9.4; SAS Institute). O efeito touro foi considerado no modelo para avaliação desta variável na taxa de prenhez. Tamanho do FD no momento da IA e ganho de peso durante o tratamento foram avaliados usando o procedimento ttest do SAS. Diferenças com  $P \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas e tendência valores de  $P$  entre 0,05 e 0,1.

### 3.3 Resultados

A incidência de DG-FP nos dois grupos foi semelhante nos diagnósticos realizados aos 21 e 22 dias pós IATF (Tabela 1). No momento da inseminação, o grupo Resynch21 apresentou maior proporção de novilhas com folículo  $\geq 11$ mm ( $P=0,04$ ) e menor proporção de novilhas com folículo  $< 8,5$ mm ( $P=0,001$ ). No entanto, a concepção foi maior nas novilhas com FD  $\geq 11$ mm (Figura 2). Não foi observada diferença entre os programas de ressincronização para taxa de ovulação, taxa de concepção nas IATFs (Resynch) e na taxa de prenhez ao final da estação.

As taxas de concepção e de ovulação foram proporcionais ao tamanho de folículo dividido nas três categorias estudadas. Contudo na média, não foi observada diferença entre os programas de ressincronização para taxa de ovulação, taxa de concepção nas IATFs (Resynch) e taxa de prenhez ao final da estação.

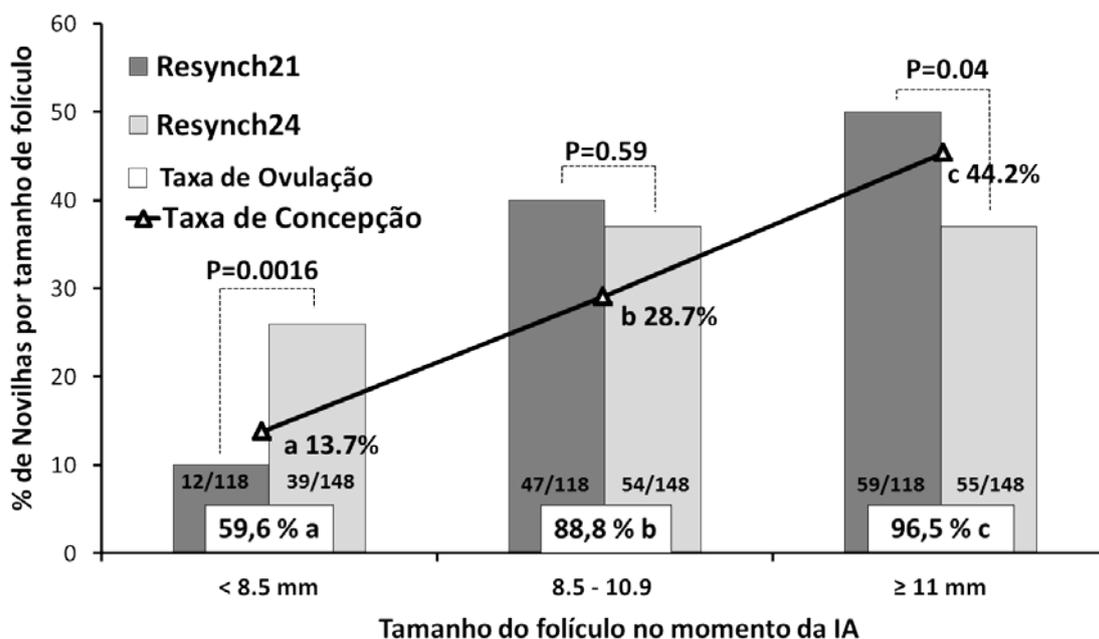
A concepção da primeira IATF foi de 24,6% (74/300) e da IATF realizada nas fêmeas diagnosticadas como falso positivo no primeiro DG foi de 21,6% (11/51). As curvas de sobrevivência dos grupos experimentais durante a estação reprodutiva estão apresentadas na

Figura 3, os momentos médios de concepção de cada programa foram aos 17 e 22 dias da estação de monta, respectivamente para novilhas no Resynch21 e Resynch24.

**Tabela 1.** Incidência de diagnóstico de gestação falso positivo, tamanho do folículo dominante (FD) no momento da inseminação artificial (IA), taxa de ovulação (TO), taxas de concepção (TC) e de prenhez ao final da estação de monta para novilhas Nelores inseminadas após dois programas de Resynch.

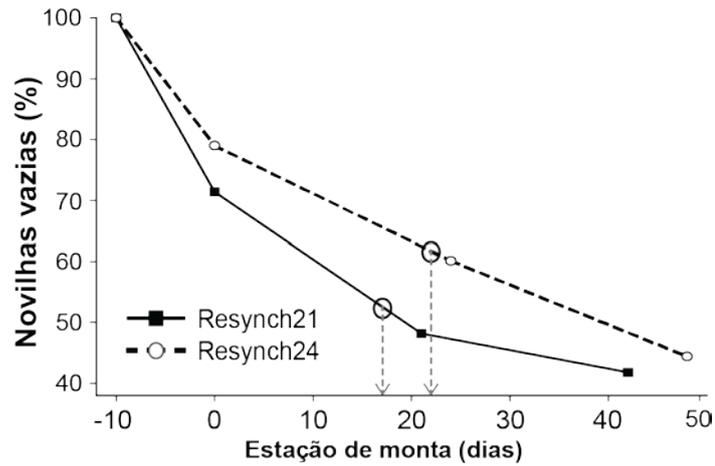
Programa	Resynch21	Resynch24	P
Falso Positivo	27,6% (29/105)	33% (31/94)	0,26
FD na IA	10,9mm ( $\pm 0,17$ )	10mm ( $\pm 0,17$ )	0,0003
TO	87% (107/123)	86,8% (132/152)	0,82
TC Resynch	33,6% (41/122)	29% (45/155)	0,40
Prenhez Final	58,5% (86/147)	55,6% (85/153)	0,64

Diferenças de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

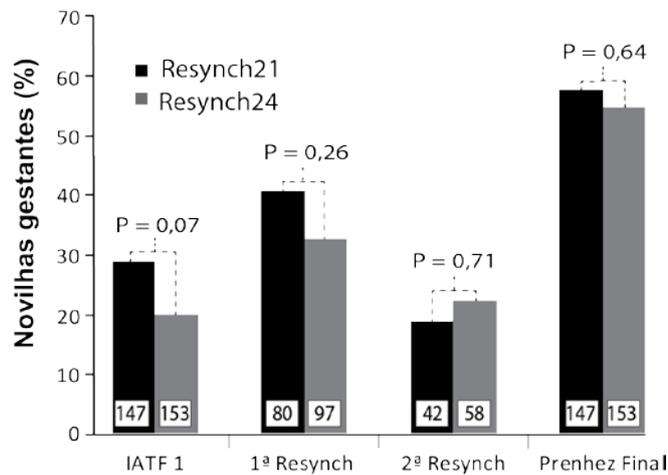


**Figura 2.** Distribuição de animais em três categorias pelo tamanho de FD no momento da IATF. Taxa de concepção e ovulação de animais em três diferentes categorias de FD no momento da IATF: folículos menores (<8,5mm); folículos intermediários (8,5-10,9mm) e folículos maiores ( $\geq 11$ mm), letras diferentes indicam  $P < 0,05$  para concepção e ovulação em diferentes categorias de tamanho de folículo.

A concepção geral para IATF-conv foi 24,6% (74/300), já nas Resynchs 1+2 foram 33,6% (41/122) e 29% (45/155), respectivamente, para novilhas PR-21 e PR-24, não sendo observada diferença para concepção entre os tratamentos ( $P=0,4$ ). Desta maneira, as taxas de concepção foram agrupadas e comparadas à TC da IATF1, onde foi observada superioridade para as concepções das Resynchs (31% vs 24,6%;  $P=0,01$ ). Na figura 4 estão apresentadas as concepções dos programas, na IATF1 foi observada uma tendência ( $P=0,074$ ) de superioridade na concepção das novilhas do Resynch21 [29,3% (43/147)] comparada a novilhas Resynch24 [20,3% (31/153)].

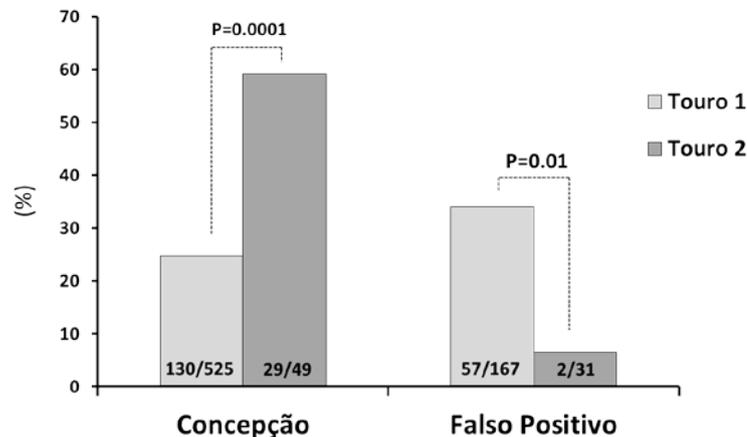


**Figura 3.** Curva de persistência de fêmeas vazias durante a estação para os Resynch21 vs. Resynch24, setas cinzas indicam o momento médio (dias) em que as novilhas engravidaram na estação, 17 e 22 dias, respectivamente, para Resynch21 e Resynch24.



**Figura 4.** Distribuição das concepções em diferentes momentos da estação de monta em novilhas Nelores.

Na figura 5 estão apresentados diferença entre touros nas concepções, 59% (29/49) e 24,8% (130/525), respectivamente, para Touros 1 e 2. Também houve diferença na incidência de DG-FP onde o Touro 1 apresentou 6,5% (2/31) e o Touro 2, 34,1% (57/167).



**Figura 5.** Efeito entre Touros para concepção e incidência de DG falso positivo.

### 3.4 Discussão

A hipótese de não haver diferença entre os programas foi suportada, visto que não foi detectada interação de concepção e incidência de DG-FP e TO.

A antecipação em um dia para realização do DG não influenciou a porcentagem de DG-FP ( $P=0,26$ ), devido as diferentes estratégias de ressincronizações, as novilhas do Resynch21 foram diagnosticadas 2 dias após a retirada do dispositivo e no outro grupo o diagnóstico precoce foi realizado no dia retirada do dispositivo, entretanto outro estudo verificou que antecipação do DG com Doppler de 22 para 20 dias, aumentou a incidência de DG-FP, de 23,3% (67/288) para 33% (106/315) em novilhas *Bos taurus indicus* [18]. No presente estudo, o diagnóstico foi antecipado, porém realizado com o proestro iniciado em novilhas vazias sincronizadas, isso facilita a diferenciação de fêmeas gestantes de não gestantes devido ao CL já estar em estágio avançado de regressão. Apesar de não haver diferença entre os programas Resynch21 (27,6%) e Resynch24 (32,9%), ambos apresentaram alta incidência de falso positivo. Os altos valores de DG falsos positivos encontrados no presente estudo diferem dos observados na literatura com Resynch superprecoce, em que a incidência de DG-FP foi de 4,5% em múltiparas e 14,8% em novilhas [11, 19]. Entretanto, de acordo com o presente resultado, outros trabalhos que avaliaram a eficiência do DG precoce pela vascularização do CL, mostraram porcentagens de falso positivo acima de 30% [15, 20, 21].

Novilhas apresentando luteólise tardia podem comprometer a eficiência do Doppler, entretanto, mesmo em fêmeas de três ondas, a luteólise em média ocorre até o 19º dia do ciclo estral, e ainda nas raças zebuínas, a regressão do CL pode ser igual ou menor a 19 dias [22, 23].

Além da luteólise tardia observada em novilhas, o alto índice de falso positivo pode estar relacionado à perda gestacional precoce, visto que alguns autores verificaram por dosagem de progesterona, perda gestacional de 30% entre o 21º e 28º dia de gestação [24] e entre 25 e 42% no primeiro mês de gestação [25]. Pois esse é um período crítico para estabelecimento da gestação em que se observa o reconhecimento materno da gestação, alongamento do embrião, manutenção do CL e produção de interferon-tau [26]. Entretanto, em vacas de corte, observa-se menor perda gestacional nesse período [27]. Por fim, a incidência de DG falso positivo utilizando a metodologia de escore de vascularização do CL pode ocorrer em função de animais que não sincronizaram ao protocolo de IATF e ovularam posteriormente mantendo um CL ativo no momento do diagnóstico por Doppler [28].

No Resynch24, as fêmeas consideradas vazias receberam um agente luteolítico, então não foi possível observar a existência de possíveis DG falso negativos. Já no Resynch21, evitou-se possíveis perdas com DG falso negativo, visto que o tratamento sugerido no presente trabalho não utiliza análogos de  $PGF2\alpha$  nem ésteres de estradiol na indução da ovulação. E o uso destes tratamentos em animais gestantes, por erro no DG, pode levar a uma perda gestacional [17]. No Resynch21 não foi observado DG falso negativo, entretanto pesquisadores relataram incidência de DG falso negativo em fêmeas avaliadas 20 a 22 dias pós IA com Doppler [15, 21]. De maneira semelhante ao observado no presente estudo, outros trabalhos não observaram DG falso negativo avaliando a perfusão vascular do CL aos 21 dias em receptoras de embrião (TE dia 7) e aos 22 dias pós IATF em fêmeas Nelores [16, 17]. Essas diferenças nas incidências de DG falsos mostram que a técnica ainda precisa ser aprimorada.

No presente estudo, as novilhas do grupo Resynch21 apresentaram maior FD devido a menor concentração de progesterona durante o crescimento folicular no protocolo de IATF, visto que no grupo Resynch24 as novilhas receberam 50mg de progesterona injetável no D0.

Estudos demonstraram que altas concentrações de P4 durante o crescimento folicular diminuem o crescimento do folículo dominante [29].

Outro aspecto que explicaria essa diferença está relacionado à dinâmica de duas ou três ondas foliculares. Estudos mostraram que a maioria das novilhas que ovulam na segunda onda, tem um aumento de FSH antes da ovulação que promove a emergência de uma terceira onda menor [30]. Porém, o crescimento é interrompido devido ao aumento das concentrações de estradiol do folículo dominante da segunda onda. Como as novilhas do grupo Resynch24 permaneceram com o dispositivo de P4 até o D22, provavelmente as novilhas que ovulariam na segunda onda tiveram regressão do dominante e emergência de outra onda. A “minor wave” também é observada em algumas novilhas de três ondas, mas com menor incidência comparada aos animais de duas ondas [30].

A taxa de ovulação foi semelhante entre os grupos apesar dos diferentes indutores da ovulação. Estudos verificaram que não existe diferença na ovulação entre os indutores GnRH e estrógenos [31-33]. No entanto, verificaram que o estrógeno melhora o ambiente uterino e do oviduto para que ocorra a fecundação. Apesar disso, recente estudo mostrou um incremento na concepção de novilhas com FD  $\geq 11$ mm no momento da IA, com ovulação induzida utilizando GnRH ao invés de estrógenos ( $P=0,03$ ), entretanto observou aumento na manifestação de estro nas novilhas com FD menor que 11mm que receberam estrógenos, porém sem causar aumento na concepção ( $P < 0,001$ ) [34]. Contudo, não houve diferença entre os tratamentos do presente trabalho e ambos apresentaram altas taxas de ovulação ( $>80\%$ ) [33].

Além de aumentar o tamanho médio do folículo dominante no momento da IA, novilhas no Resynch21 apresentaram menor proporção de novilhas com folículos de tamanho inferior que 8,5mm comparado com as novilhas Resynch24. Este resultado mostra uma vantagem para a nova sincronização proposta já que a categoria de folículos com tamanho inferior apresentou uma menor taxa de ovulação e conseqüentemente menor taxa de concepção. Quando foi avaliado a categoria de folículos com tamanho  $\geq 11$ mm observou-se uma maior taxa de ovulação e concepção e com maior proporção de novilhas do programa Resynch21. Essa análise com diferentes categorias de folículos mostra que realmente o Resynch21 proporcionou um melhor tamanho de folículo no momento da IA com maior chance de ovular e ainda com maior chance da novilha conceber.

A concepção geral da IATF1 foi inferior à das concepções agrupadas das resincronizações. O aumento da concepção nas Resynchs provavelmente está ligado a um efeito benéfico da exposição das novilhas à progesterona na IATF1 [29]. A tendência ( $P=0,074$ ) de aumento na concepção da IATF1 nas novilhas do Resynch21, pode estar ligada a antecipação de 2 dias na inserção do dispositivo de progesterona. Trabalhos mostraram que momentos diferentes para iniciar suplementação de progesterona pós IA podem interferir no desenvolvimento do embrião, concepção e na perda gestacional [35, 36]. Apesar das diferenças entre dias e tratamentos, a concepção nas Resynchs e prenhez acumulada ao final da estação de monta foi semelhante entre os programas.

Foi observado efeito entre touros na taxa de concepção e na incidência de DG-FP. Existe grande variação na concepção de touros, como observado nos resultados de mais de 60 mil IATFs que mostraram concepções variando de 7,2% a 77,3% entre diferentes touros [37]. O número de fêmeas inseminadas com o touro que apresentou maior concepção foi pequeno, então a prenhez final dos dois programas foi afetada pelo touro que apresentou menor concepção, o qual foi utilizado em cerca de 76% (525/692) das inseminações.

Inseminações fixas com intervalo de 21 dias anteciparam o momento médio de prenhez em 5 dias comparado ao Resynch24. A estação de monta com mais de uma indução da ovulação possibilita que fêmeas que não emprenharam na IATF1 sejam acasaladas mais uma vez com touro de elevado mérito zootécnico. Essa estratégia causa um incremento na

taxa de prenhez ao final da estação comparado com fêmeas que recebem apenas uma IATF e também aumenta o mérito zootécnico da progênie justificando o maior investimento com medicamentos, sêmen e mão de obra [13, 38, 39]. Além disso, o Resynch21 facilita o manejo, pois as atividades são realizadas sempre no mesmo dia da semana.

Dessa forma, conclui-se que a nova proposta de Resynch para inseminações com intervalo de 21 dias em Nelore apresentou eficiência semelhante na incidência de DG-FP, nas taxas de ovulação e prenhez ao final da estação do que o Resynch24 e ainda encurtou em 5 dias o momento médio de gestação e propiciou um melhor tamanho de folículo no momento da IA.

### 3.5 Referências Bibliográficas

- [1] Pursley J, Mee M, Wiltbank M. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*. 1995;44:915-23.
- [2] Baruselli PS, de Souza AH, de Sá Filho MF, Marques MO, de Sousa Sales JNl. Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim Reprod*. 2018;15:247-55.
- [3] Bisinotto R, Ribeiro E, Martins L, Marsola R, Greco L, Favoreto M, et al. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *Journal of dairy science*. 2010;93:5798-808.
- [4] 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.
- [5] Colazo M, Kastelic JP, Mainar-Jaime R, Gavaga Q, Whittaker P, Small J, et al. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*. 2006;65:557-72.
- [6] Bartolome J, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Arteché A, Silvestre F, et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology*. 2005;63:1628-42.
- [7] Bartolome J, Sozzi A, McHale J, Swift K, Kelbert D, Archbald L, et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. *Theriogenology*. 2005;63:1643-58.
- [8] Bartolome J, Van Leeuwen J, Thieme M, Sa'Filho O, Melendez P, Archbald L, et al. Synchronization and resynchronization of inseminations in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol. *Theriogenology*. 2009;72:869-78.
- [9] Sá Filho M, Marques M, Giroto R, Santos F, Sala R, Barbuio J, et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology*. 2014;81:284-90.
- [10] Fricke P, Caraviello D, Weigel K, Welle M. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *Journal of dairy science*. 2003;86:3941-50.
- [11] Penteado L, Rezende R, Mingoti R, Colli M, Sá Filho M, Santos F, et al. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. *Animal Reproduction*. 2016;13:450.
- [12] Fricke P. Scanning the Future—Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle<sup>1</sup>. *Journal of dairy science*. 2002;85:1918-26.

- [13] Edwards S, Bo G, Chandra K, Atkinson P, McGowan M. Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 2015;83:114-20.
- [14] Wiltbank MC, Pursley JR. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*. 2014;81:170-85.
- [15] Siqueira L, Areas V, Ghatti A, Fonseca J, Palhao M, Fernandes C, 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.
- [16] Guimarães C, Oliveira M, Rossi J, Fernandes C, Viana J, Palhao M. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology*. 2015;84:237-41.
- [17] 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, 1-12.
- [18] Simões LMS, Lima EA, Santos APC, Orlandi RE, Bottino MP, Marinho PHA, et al. Effects of the administration of short-acting progesterone and intravaginal progesterone device permanence on follicular dynamics and pregnancy rate of resynchronized *Bos indicus* heifers 14 days after TAI. Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). Florianópolis, SC, Brazil: Animal Reproduction; 2018. p. 331.
- [19] Colli MHA, Rezende RG, Elliff FM, Zanatta G, Mingoti R, Jr W, et al. Productive and reproductive correlations that influence the pregnancy rate of 14 month old Nellore heifers submitted to 3 FTAI in 48 days using color Doppler ultrasonography. Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil,: Animal Reproduction; 2017. p. 676.
- [20] Utt M, Johnson Iii G, Beal W. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*. 2009;71:707-15.
- [21] Scully S, Butler S, Kelly A, Evans A, Lonergan P, Crowe M. Early pregnancy diagnosis on days 18 to 21 postinsemination using high-resolution imaging in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 2014;97:3542-57.
- [22] Sartori R, Barros C. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*. 2011;124:244-50.
- [23] Sartori R, Haughian J, Shaver R, Rosa G, Wiltbank M. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of dairy science*. 2004;87:905-20.
- [24] Chebel RC, Santos JE, Cerri RL, Galvão KN, Juchem SO, Thatcher WW. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2003;60:1389-99.
- [25] Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2016;86:239-53.
- [26] Green J, Okamura C, Poock S, Lucy M. Measurement of interferon-tau (IFN- $\tau$ ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20 d after insemination in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 2010;121:24-33.
- [27] Diskin M, Waters S, Parr M, Kenny D. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility and Development*. 2016;28:83-93.
- [28] Pugliesi G, Rezende RG, Silva J, Lopes E, Nishimura TK, Baruselli PS, et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2017;41:140-50.

- [29] SÁ FILHO M, GIMENES L, SALES J, CREPALDI G, MEDALHA A, BARUSELLI P. IATF em novilha. Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada. 2008;3:54-67.
- [30] Ginther O, Rakesh H, Bashir S, Hoffman M. Minor FSH surge, minor follicular wave, and resurgence of preovulatory follicle several days before ovulation in heifers. *Theriogenology*. 2014;81:437-45.
- [31] Sá Filho M, Baldrighi J, Sales J, Crepaldi G, Carvalho J, Bó G, et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*. 2011;129:132-9.
- [32] Sá Filho M, Santos J, Ferreira R, Sales J, Baruselli P. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*. 2011;76:455-63.
- [33] Sales J, Carvalho J, Crepaldi G, Cipriano R, Jacomini J, Maio J, et al. 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*. 2012;78:510-6.
- [34] Silva EP, Wiltbank MC, Machado AB, Gambin LS, Dias MM, Chaiben MF, et al. Optimizing timed AI protocols for Angus beef heifers: Comparison of induction of synchronized ovulation with estradiol cypionate or GnRH. *Theriogenology*. 2018;121:7-12.
- [35] Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- $\tau$  production in the cow. *The Veterinary Journal*. 2006;171:500-3.
- [36] Couto SRB, Guerson YB, Ferreira JE, Silva OR, Silenciato LN, Barbero RP, et al. Impact of supplementation with long-acting progesterone on gestational loss in Nelore females submitted to TAI. *Theriogenology*. 2019;125:168-72.
- [37] Sá Filho O, Meneghetti M, Peres R, Lamb G, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 2009;72:210-8.
- [38] Rodrigues WB, do Prado Jara J, Borges JC, de Oliveira LOF, de Abreu UPG, Anache NA, et al. Efficiency of mating, artificial insemination or resynchronisation at different times after first timed artificial insemination in postpartum Nelore cows to produce crossbred calves. *Animal Production Science*.
- [39] Crepaldi G, Freitas B, Mingoti R, Colli M, Gonçalves Junior W, Ferreira R, et al. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. *Animal Reproduction*. 2017;14:698.

## 4. CAPÍTULO II

Artigo em preparação para ser submetido à revista Animal Reproduction Science

### **DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO PRECOCE AOS 21 DIAS UTILIZANDO ULTRASSONOGRRAFIA MODO DOPPLER OU B EM NELORES**

J.P.N. Andrade<sup>a</sup>, F. Sonnewend<sup>a,b</sup>, Y.B. Guerson<sup>a</sup>, R.R. Domingues<sup>b</sup>, V.E. Gomez-León<sup>b</sup>, T.O. Cunha<sup>c</sup>, J.C.F. Jacob<sup>a</sup>, M.C. Wiltbank<sup>b</sup>, J.N. Sales<sup>d</sup>, M.R.B. Mello<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro 23897-000, Brasil

<sup>b</sup> Department of Dairy Science, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin 53706, USA

<sup>c</sup> Department of Medical Science, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin 53706, USA

<sup>d</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brasil

\* Correspondência do autor: Marco R. B. Mello; Tel.: +55 (21) 981721892.  
E-mail: mmrural@gmail.com

## DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO PRECOCE AOS 21 DIAS UTILIZANDO ULTRASSONOGRRAFIA MODO DOPPLER OU B EM NELORES

### RESUMO

O objetivo foi comparar a eficiência da ultrassonografia Doppler (US-Doppler) com o modo B (US-B) no diagnóstico de gestação (DG) superprecoce aos 21 dias pós-IATF. Foram sincronizadas 76 novilhas Nelores pesando em média 333,4 ( $\pm$  28,6) kg para realização da IATF, sendo o dia da inseminação considerado D0. No D12, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis, Brasil). No D19, o dispositivo foi removido e foram aplicados 300UI de eCG (Folligon®, MSD, Brasil). O DG foi realizado no D21, sendo que as fêmeas consideradas vazias receberam aplicação de 0,1mg de gonadorelina (Fertagyl®, MSD, Brasil) e foram inseminadas imediatamente. Uma réplica deste tratamento foi realizada após a 2ª IATF. O DG foi realizado com um ultrassom Doppler Mindray, modelo Z5VET. O DG Doppler foi baseado no escore subjetivo de área vascularizada do CL que variou de 0 a 4 (0 = 0%; 1 = 1 a 25%; 2 = 26 a 50%; 3 = 51 a 75% e 4 = 76 a 100%) sendo consideradas gestantes, animais com escore  $\geq$  2. Com o registro das imagens de vídeo dos ovários, cinco avaliadores repetiram a classificação do escore de vascularização. Posteriormente, visualizando somente as imagens no modo B, o CL foi avaliado e classificado em dois escores subjetivos relacionados ao seu tamanho e ecogenicidade. Escore de tamanho: 1 = pequeno (CL  $\leq$  13mm); 2 = médio (CL entre 13 e 19mm) e 3 = grande (CL > 19mm). Escore de ecogenicidade: 1 = baixa ecogenicidade e 2 = alta ecogenicidade. Foram consideradas gestantes, novilhas que apresentavam CL com alta ecogenicidade. Em relação ao escore de tamanho, novilhas gestantes eram as que apresentavam CL grande ou médio. Na associação das duas técnicas, foi considerada gestante somente novilhas que apresentassem 1 CL médio ou grande com alta ecogenicidade. As imagens foram analisadas com auxílio do Adobe Photoshop e ImageJ para extração objetiva de pixels e diâmetro do CL. A confirmação do DG Doppler na 2ª e 3ª resynch foi realizada 12 dias após as IAs e o DG final foi realizado 33 dias após a última IA. As variáveis foram comparadas utilizando o pacote de programas SAS. Número de pixels coloridos, ecogenicidade /mm<sup>2</sup> e diâmetro apresentaram correlação de 0.65, 0.42 e 0.70, respectivamente, com o DG aos 33 dias ( $P < 0,0001$ ). Acurácia, sensibilidade e valor preditivo negativo (VPN) do diâmetro do CL foram similares à contagem de pixels coloridos. Todos avaliadores apresentaram correlações similares dos escores com seus respectivos valores objetivos ( $P < 0,0001$ ). Somente escores de vascularização tiveram mesma eficiência que a avaliação objetiva, contudo escores de tamanho e ecogenicidade juntos tiveram acurácia 88%, similar aos escores de vascularização 87.8%. As metodologias de escores subjetivos apresentaram eficiência similar pela análise na curva ROC ( $P = 0,34$ ). O DG falso positivo foi de 22,7% e 19,2% ( $P = 0,3$ ), já o DG falso negativo foi 0% e 5,4% ( $P = 0,0001$ ), respectivamente para DG no modo Doppler e modo B (ecogenicidade e tamanho). As metodologias apresentaram mesma acurácia, entretanto foi observada incidência significativa de DG falso negativo utilizando US-B.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva, corpo lúteo, ultrassom.

## EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS AT THE 21 DAYS WITH ULTRASOUND IN DOPPLER MODULE OR B IN NELLORE

### ABSTRACT

The objective was to compare the efficiency of early pregnancy diagnosis (PD) using Color Doppler ultrasound mode (US-Doppler) with ultrasound mode B (US-B). The PD was performed on day 21 after fixed time artificial insemination (FTAI). A total of 76 Nellore heifers weighing (average)  $333.4 \pm 28.6$  kg were used on this study. The heifers were synchronized for FTAI and the insemination day was assigned as D0. On D12, the heifers received an intravaginal device of 1.9 g of progesterone (CIDR®, Zoetis, Brasil). On D19, the progesterone device was withdrawn, and the heifers received (im) 300 UI of equine Chorionic Gonadotropin (Folligon®, MSD, Brasil). On D21, non-pregnant heifers (US-Doppler), received (im) 0,1mg of Gonadoreline (Fertagyl®, MSD, Brasil) and were immediately inseminated. A second FTAI protocol was performed and the same methodology was used on the non-pregnant heifers. The US-Doppler was made with Z5VET Mindray ultrasound (China). The US-Doppler diagnosis was based on a subjective score of the Corpus Luteum (CL) blood flow area. The scores were: 0 = 0%; 1 = 1 to 25%; 2 = 26 to 50%; 3 = 51 to 75% and 4 = 76 to 100%. Using Doppler recorded videos of the ovaries, five different technicians were asked to evaluate and score the CL blood flow area. The same technicians were then asked to subjectively evaluate the sized and echogenicity of the CL by using mode B recorded videos of the same ovaries evaluated before by Doppler videos. The size scores consisted in: 1 = small ( $CL \leq 13$  mm); 2 = medium ( $13 \text{ mm} < CL \leq 19$  mm); and 3 = large ( $CL > 19$  mm), whereas the echogenicity scores consisted in: 1 = hypo-echogenic and 2 = hyper-echogenic). US-Doppler score, size score, and echogenicity scores  $\geq 2$  were considered from CL of a pregnant heifer. The pixel extraction and CL diameter were analyzed using Adobe Photoshop and ImageJ. Confirmation of the US-Doppler pregnancy diagnosis was performed 12 days after each insemination; and the final pregnancy diagnosis was performed 33 days after the last insemination. The data was compared using the SAS program. Number of color pixels, echogenicity/mm<sup>2</sup> and diameter of CL had correlation of 0.65, 0.42 e 0.70, respectively, with the pregnancy diagnosis on day 33 ( $P < 0.0001$ ). The accuracy, sensibility and predictive negative value of diameter CL were similar to the color pixels number. All the technicians had subjective results similar to those with objective technique ( $P < 0.0001$ ). The CL blood flow score had similar accuracy (87.8%) that the objective evaluations, however size and echogenicity scores combined had an accuracy of 88%. The US-Doppler and the US-B techniques had similar efficiency when analyzed by a ROC curve ( $P=0.34$ ). PD false positive was 22.7% and 19.2% ( $P=0.3$ ), whereas the PD false negative was 0% and 5.4% ( $P = 0.0001$ ), respectively, for US-Doppler and the US-B techniques. It was concluded that both methodologies have similar accuracy, however it was observed a significance increased of PD false negative using ultrasound in mode-B over the incidence observed for US-Doppler.

**Key-words:** Reproductive efficiency, corpus luteum, ultrasound.

## 4.1 Introdução

A busca por ferramentas ou estratégias de diagnóstico de gestação (DG) precoce é de grande importância no desempenho reprodutivo (Fricke et al., 2016), pois pelo simples fato de descobrir que uma fêmea não concebeu após o último serviço, possibilita ao técnico intervir com estratégias que façam com que essa fêmea receba um novo serviço o mais cedo possível aumentando a taxa de prenhez do rebanho (Sá Filho et al., 2014; Crepaldi et al., 2017).

Alta acurácia, simplicidade de execução a campo, baixo custo e resposta imediata do status de gestação são atributos de uma boa ferramenta para DG, entretanto a eficiência do diagnóstico cada vez mais precoce esbarra na fertilidade individual de cada propriedade, pois a maior perda gestacional nas primeiras semanas limita a precisão dos testes de gestação precoce aumentando o número de DG falso positivo (DG-FP) (Fricke et al., 2016).

Métodos indiretos como o ISG (gene estimulador de interferon), PAG (prenhez associada à glicoproteínas), concentrações plasmáticas de P4 (progesterona) e PSPB (proteína específica de prenhez B) apresentam uma boa acurácia, entretanto o alto custo da execução e por não serem testes de resposta imediata limitam seu uso em programas comerciais (Chebel et al., 2003; Green et al., 2010; Pugliesi et al., 2014; Ricci et al., 2015; Martins et al., 2018). Estudos avaliando a perfusão vascular do corpo lúteo (CL) com ultrassonografia modo Doppler (US-Doppler) como método imediato para DG precoce mostrou-se eficiente, assim como outros métodos indiretos (Matsui and Miyamoto, 2009; Pugliesi et al., 2014). Dessa maneira, foi possível sua aplicação (US-Doppler) em grande escala e estudos apontam sua emergência em programas comerciais (Penteado et al., 2016; Pugliesi et al., 2017). Entretanto o custo de uma máquina equipada com tecnologia Doppler é cerca de três vezes maior que um aparelho de US convencional (modo B).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi comparar a eficiência da ultrassonografia Doppler (US-Doppler) com o modo B (US-B) no diagnóstico de gestação superprecoce em novilhas Nelores aos 21 dias pós IATF pela avaliação do corpo lúteo (CL).

As hipóteses testadas foram: (1) escores subjetivos com US-Doppler ou B apresentam alta correlação com avaliação objetiva de pixels e tamanho do CL; (2) ambos apresentam uma boa acurácia e mesma eficiência quando realizados aos 21 pós IATF em novilhas ressincronizadas.

## 4.2 Material e Métodos

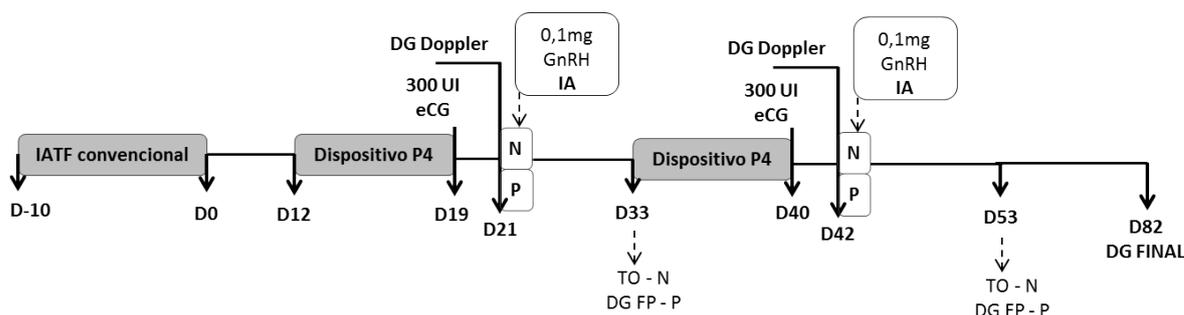
### 4.2.1 Local, período e animais

O presente trabalho foi realizado na Fazenda Santana (Valença-RJ) na estação reprodutiva 2017/2018, utilizando 76 fêmeas Nelores, nulíparas, não gestantes e com peso médio de 333,4 ( $\pm$  28,6) kg, mantidas em pastagem brachiaria brizantha, tendo acesso *ad libitum* à água e ao suplemento mineral seletivo. Todos os animais foram submetidos previamente à triagem ginecológica por palpação retal e ultrassonografia, sendo descartadas novilhas gestantes ou com alterações no trato reprodutivo (cisto folicular, infecção uterina, cérvix tortuosa ou fibrosada). O presente projeto teve a aprovação do comitê de ética na pesquisa do Instituto de Veterinária da UFRRJ, protocolada sob o CEUA nº 1730040918.

### 4.2.2 Sincronização da ovulação, IATF e ressincronizações

Os tratamentos hormonais para IATF iniciaram em dia aleatório do ciclo estral, sendo este dia considerado dia menos dez (D-10). Neste momento, as novilhas receberam um dispositivo intravaginal (DI) contendo 1,9g de progesterona de terceiro uso (CIDR®, Zoetis, Brasil) e aplicação intramuscular (im) de 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®,

Ourofino, Brasil). No D-2, o DI foi removido e foram aplicados 150µg de cloprostenol (Veteglan®, Hertape, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis, Brasil) e 300UI de eCG (Folligon®, MSD, Brasil). A IATF foi realizada na manhã do D0 em todas as novilhas. Após 12 dias (D12) da IATF, iniciaram-se os tratamentos de ressinchronização, onde todas as novilhas receberam novamente um DI. No D19, o DI foi removido e foram aplicados 300UI de eCG. Na manhã do D21, foi realizado o diagnóstico de gestação com auxílio de um ultrassom Doppler, sendo que as novilhas consideradas não gestantes foram inseminadas imediatamente após diagnóstico de gestação e receberam uma aplicação im de 0,1mg de gonadorelina (Fertagyl®, MSD, Brasil). No D33, as novilhas consideradas vazias na última avaliação receberam novamente um DI, repetindo o tratamento de ressinchronização para uma terceira e última IATF, assim como a metodologia de DG descrita anteriormente.



**Figura 1.** Ilustração dos programa de Resynch21: (Dispositivo P4) dispositivo intravaginal de progesterona; (BE) benzoato de estradiol; (CE) cipionato de estradiol; (eCG) gonadotrofina coriônica equina; (PGF) cloprostenol sódico; (50mg P4) progesterona injetável de longa ação; (GnRH) gonadorelina; (DG Doppler) diagnóstico de gestação Doppler; (DG Final) diagnóstico de gestação ao final da estação de monta; (TO) taxa de ovulação; (P) diagnóstico positivo; (N) diagnóstico negativo; (DG FP) verificação de diagnósticos falsos.

#### 4.2.3 Diagnóstico de gestação modo-Doppler

O diagnóstico de gestação precoce foi realizado com auxílio de um ultrassom Doppler Mindray, modelo Z5VET, equipado com transdutor linear 75L50EAV e emissão de onda de 5,0/7,5 MHz padronizando o ganho total de 70%. A metodologia para realização do diagnóstico de gestação foi baseada no escore de vascularização do CL classificado de maneira subjetiva em uma escala de 0 a 4 (0= 0%; 1= 1 a 25%; 2= 26 a 50%; 3= 51 a 75% e 4=76 a 100% de área vascularizada) onde o animal com escore  $\leq 1$  foi considerado não gestante e os animais que apresentaram escore  $\geq 2$ , gestantes, conforme Figura 2.

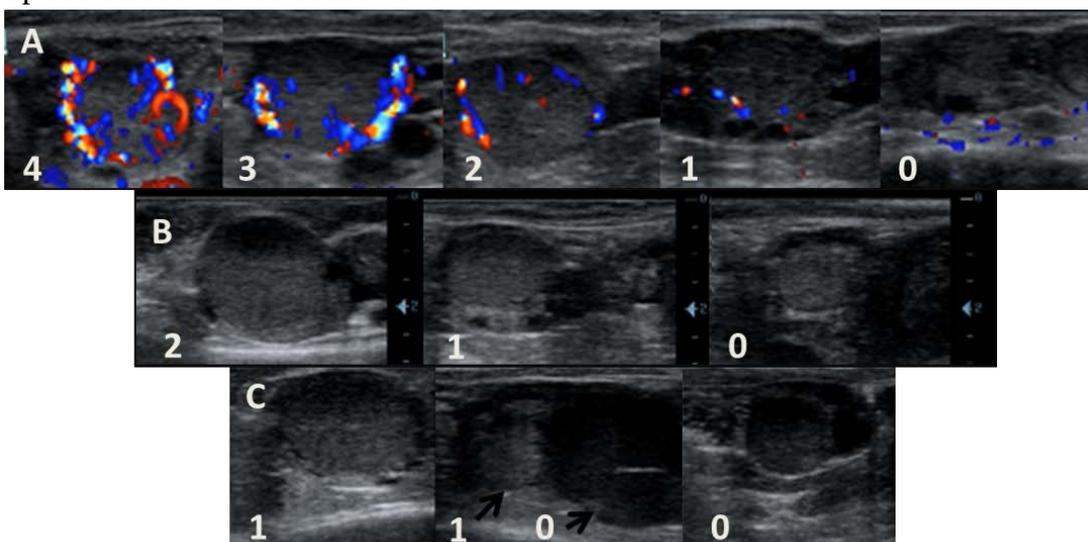
#### 4.2.4 Diagnóstico de gestação modo-B

O aparelho de US foi utilizado o tempo todo no modo sinc-dual, onde na tela eram mostrados de forma simultânea o modo B e Doppler, então, vídeos dos ovários foram gravados e identificados para posterior análise somente no modo B. Os vídeos foram reavaliados de forma que apenas era mostrado para o avaliador imagens dos ovários no modo B sem nenhuma outra informação. O mesmo avaliador que realizou o escore subjetivo de vascularização, dessa vez avaliou o CL no modo B classificando dois escores subjetivos relacionados ao tamanho e ecogenicidade. Escore de tamanho do CL: 1 = pequeno (CL < 13mm); 2 = médio (CL entre 13 e 19mm) e 3 = CL grande (> 19mm). Escore de ecogenicidade do CL: 1 = baixa ecogenicidade (poucas áreas ecogênicas) e 2 = alta ecogenicidade (muitas áreas ecogênicas). Analisando de forma separada, pelo escore de ecogenicidade, novilhas gestantes eram as que apresentavam CL com alta ecogenicidade, e em relação ao escore de tamanho, novilhas gestantes eram as que apresentavam CL grande ou

médio. Na associação das duas técnicas, foi considerada gestante somente novilhas que apresentassem pelo menos 1 CL médio ou grande com alta ecogenicidade (Figura 2).

#### 4.2.5 Verificações de DG falso e diagnóstico de prenhez

A confirmação do 1º DG Doppler foi realizada no dia em que foi colocado o DI para 2ª Resynch e a confirmação do 2º DG Doppler foi realizada 12 dias após a última IA. O DG final foi realizado 33 dias após a última IA sendo considerada gestante a novilha que apresentasse uma vesícula embrionária.



**Figura 2.** Ilustração dos escores de avaliação do corpo lúteo. A) escores de vascularização do CL, 4:100 a 75%, 3:75 a 50%, 2: 50 a 25%, 1: 25 a 1% e 0: 0% de área vascularizada. B) escores de tamanho, 2: >19mm, 1: 19 a 13mm e 0: ≤ 13mm. C) escores de ecogenicidade, 1: muitos pontos ecogênicos e 0: poucos pontos ecogênicos.

#### 4.2.6 Análise Objetiva de Pixels e Tamanho do CL

##### 4.2.6.1 Imagens modo Doppler

Foi selecionada a imagem que apresentasse maior área de vascularização do CL, sendo posteriormente transferida para o Adobe Photoshop (CS4 version 11.0, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) onde foram selecionados somente os pontos coloridos em tons de azul e vermelho. Posteriormente, com auxílio do programa Image J® (version 1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), foi extraído o histograma com a contagem de pixels, sendo possível obter o número total de pixels coloridos de cada CL.

##### 4.2.6.2 Imagens modo B

Primeiramente utilizando o ImageJ, foi mensurado o tamanho do CL em milímetros. Para avaliar a ecogenicidade, foi selecionada uma imagem no modo B que apresentasse maior intensidade de pixels ecogênicos no CL, depois se procedeu da mesma forma como descrito para extração de pixels coloridos, só que dessa vez selecionando pixels no CL com a escala em tons de cinza. Depois de se obter o histograma, foi utilizado o valor de intensidade dos pixels e, por fim, dividido pelo tamanho do CL, assim cada imagem teve um valor objetivo de intensidade de pixels/mm<sup>2</sup>.

#### 4.2.7 Validações dos escores subjetivos

Cinco diferentes avaliadores fizeram separadamente a avaliação dos vídeos no modo B e Doppler, classificando o CL com os escores descritos acima. O número de avaliadores

escolhido foi baseado em estudos que fizeram validações de escores subjetivos de estruturas ovarianas (De Tarso et al., 2016). Não houve treinamento dos técnicos para as avaliações, entretanto todos tinham experiência em ultrassonografia reprodutiva em bovinos.

#### 4.2.8 Análise estatística

Foram realizadas regressões logísticas entre a contagem objetiva de pixels coloridos, diâmetro do CL (mm) e ecogenicidade/mm<sup>2</sup> correlacionadas de forma separada com o DG aos 33 dias utilizando o procedimento PROC LOGISTIC do programa SAS (Version 9.4; SAS Institute) aplicando a curva de probabilidade de concepção em relação a cada variável contínua e também pelos valores de tamanho e ecogenicidade analisados de forma simultânea.

Os escores subjetivos de perfusão vascular, tamanho e ecogenicidade do CL realizados pelos cinco avaliadores foram correlacionados com os valores objetivos de pixels coloridos, diâmetro do CL e intensidade/mm<sup>2</sup> de pixels em tons de cinza utilizando o procedimento PROC CORR do SAS.

A interação entre avaliadores foi realizada em um modelo utilizando o procedimento GLIMMIX do programa SAS. A incidência de diagnósticos falsos teve que ser analisada utilizando o procedimento PROC FREQ do SAS utilizando o valor de qui-quadrado, pois uma das metodologias não apresentou incidência de DG falso negativo.

Teste de confiança foi realizado comparando as metodologias de DG precoce com o DG realizado aos 33 dias pós IA. As fórmulas utilizadas foram: Sensibilidade =  $[a/(a + c)] * 100$ ; Especificidade =  $[d/(b + d)] * 100$ ; Valor Preditivo Positivo =  $[a/(a + b)] * 100$ ; Valor Preditivo Negativo =  $[d/(c + d)] * 100$  e Acurácia =  $[(a + d)/(a + b + c + d)] * 100$  onde a = número de novilhas que foram diagnosticadas prenhes no dia 21 e estavam prenhes no dia 33; b = número de novilhas que foram diagnosticadas como prenhes no dia 21 e estavam vazias no dia 33; c = novilhas que foram diagnosticadas como vazias no dia 21 e estavam prenhes no dia 33 e d = novilhas que foram diagnosticadas com vazias no dia 21 e estavam vazias no dia 33. Para avaliar significância dos valores de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e Acurácia foi utilizado o procedimento PROC FREQ aplicando a avaliação do teste qui quadrado. Os testes de confiança foram realizados comparando os valores objetivos e posteriormente os valores de escores subjetivos.

As eficiências dos testes foram comparadas, utilizando o procedimento PROC LOGISTIC no programa SAS aplicando a avaliação ROC CURVE para verificar a área sob a curva de cada teste e também a comparação entre ambos considerando o valor do qui-quadrado. Probabilidades  $\leq 0,05$  foram consideradas significativas.

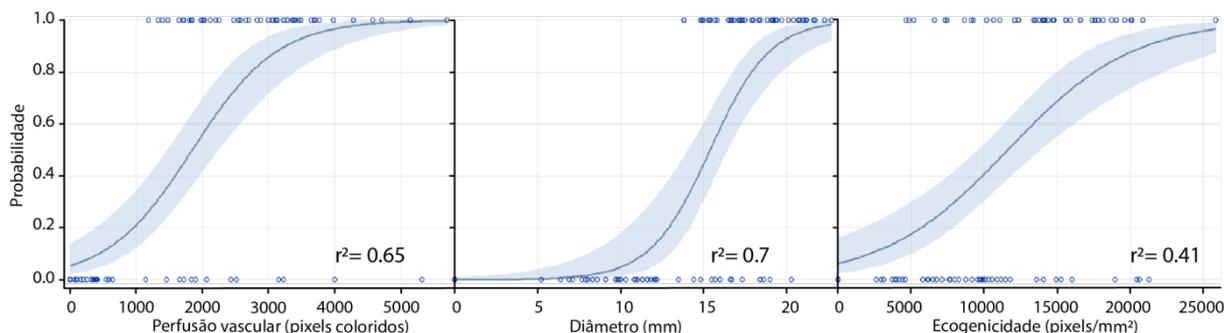
#### 4.3 Resultados

A taxa de concepção da primeira IATF foi 38,2% (29/76) as concepções da ressincronizações foram 42,6% (26/61) e a prenhez ao final da estação somente com inseminações foi de 72,4% (55/76).

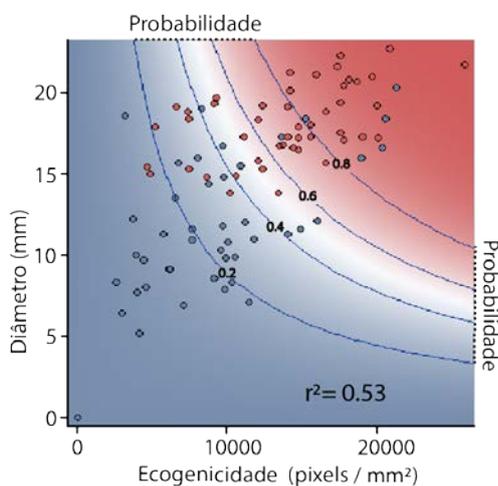
As curvas de probabilidade de concepção das três variáveis contínuas estão apresentadas na Figura 3, sendo que os modelos convergiram de forma satisfatória e foram significativos ( $P < 0,0001$ ). Os valores de correlação do  $r^2$  para as análises contínuas foram 0,65; 0,41 e 0,7, respectivamente, para os valores objetivos de pixels coloridos, ecogenicidade /mm<sup>2</sup> e diâmetro do CL. Adicionalmente, foi realizada regressão logística associando os dois parâmetros objetivos da avaliação no modo B (tamanho e ecogenicidade), sendo que a regressão convergiu de forma satisfatória com valor de  $r^2$  de 0,53 e  $P < 0,0001$  (Figura 4).

O teste de confiança para valores objetivos mostrou máxima eficiência em detectar fêmeas vazias com valores de perfusão vascular e diâmetro do CL, entretanto foi encontrada baixa eficiência utilizando os valores ecogenicidade /mm<sup>2</sup> (Tabela 1).

Os escores subjetivos de vascularização e tamanho dos cinco avaliadores tiveram alta correlação com a contagem objetiva de pixels coloridos e diâmetro do CL ( $P < 0,0001$ ). Já o escore de ecogenicidade apresentou correlação inferior, sendo apresentados na Tabela 2.



**Figura 3.** Regressões logísticas entre valores objetivos de pixels coloridos, tamanho do CL (mm) e ecogenicidade /mm<sup>2</sup> e a probabilidade de concepção os valores de  $r^2$  foram, respectivamente, 0,65, 0,41 e 0,7.



**Figura 4.** Regressão logística de tamanho do CL (mm) analisados com ecogenicidade /mm<sup>2</sup> e a probabilidade de concepção ( $r^2 = 0,53$ ).

Não foi observado efeito de avaliador, então cada diagnóstico foi considerado como uma unidade experimental para realização dos testes de confiança dos escores subjetivos (113 exames de cada técnico;  $n = 565$ ). Os resultados do teste de confiança estão apresentados na Tabela 3, associando os parâmetros subjetivos do modo B (tamanho e ecogenicidade). Os escores subjetivos do modo B, avaliados individualmente, apresentaram baixa eficiência, pois tiveram menor sensibilidade e especificidade, mas o DG somando os escores de ecogenicidade e tamanho apresentaram acurácia superior que seus próprios resultados e ainda aumentou o valor preditivo positivo. Baseando-se por escores, o único método que apresentou máximo valor preditivo negativo foram os escores de vascularização, os outros escores apresentaram incidência de diagnósticos falsos negativos, não sendo possível replicar a eficiência objetiva do diâmetro em escores.

Para verificar se houve diferença significativa entre os testes, foi utilizada a análise da Curva Roc, onde através da sensibilidade e especificidade de cada teste é gerada uma área sob a curva e as duas são comparadas. Nas Figuras 5 e 6 estão apresentadas as avaliações da Curva Roc com a eficiência dos métodos de diagnóstico de gestação precoce objetivo e subjetivo, onde o método de menor eficiência foi o que considerou os escores de ecogenicidade.

Não foram observadas diferenças na incidência de DG falso positivo entre as avaliações com ultrassom no modo Doppler 22,7% (69/304) ou B 19,2% (52/271) (P= 0,30). O DG realizado, utilizando os escores subjetivos de perfusão vascular do CL não apresentou incidência de DG falso negativo 0% (0/261), entretanto nos diagnósticos com escores subjetivos de tamanho e ecogenicidade houve um aparecimento de 5,4% (16/294) de DG falso negativo, onde foi observada uma alta significância nessa diferença (P=0,0001).

**Tabela 1.** Testes de confiança utilizando valores objetivos como método de diagnóstico de gestação precoce em novilhas Nelores.

	Dia 33	Dia 21 - Perfusão Vascular (pixels)	Dia 21 - Ecogenicidade (pixel/mm <sup>2</sup> )	Dia 21 - Diâmetro (13mm)
Gestante	47	59	47	62
Vazia	66	54	66	51
Total	113	113	113	113
Sensitividade	-	100% <sup>a</sup>	74,5% <sup>b</sup>	100% <sup>a</sup>
Especificidade	-	81,8%	81,8%	77,3%
VPP	-	79,7%	74,5%	75,8%
VPN	-	100% <sup>a</sup>	81,8% <sup>b</sup>	100% <sup>a</sup>
Acurácia	-	89,4% <sup>a</sup>	78,8% <sup>b</sup>	86,7% <sup>a</sup>

VPP= valor preditivo positivo, VPN= valor preditivo negativo, ponto de corte foi o maior valor objetivo do corpo lúteo de cada análise no grupo de fêmeas vazias que não diminuísse a acurácia. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

**Tabela 2.** Coeficiente de correlação entre valores objetivos pixels coloridos, tamanho do CL (mm) e ecogenicidade /mm<sup>2</sup> com escores subjetivos de cinco avaliadores.

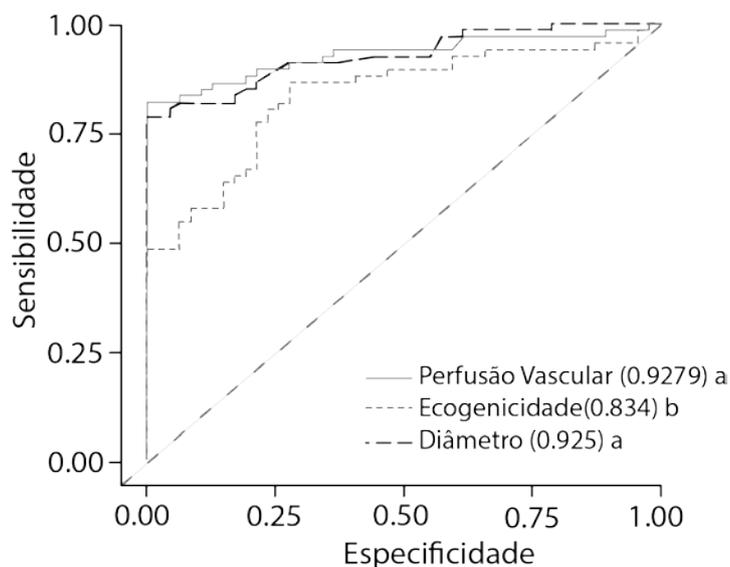
	Avaliador	1	2	3	4	5
Pixels Coloridos (Doppler)	r <sup>2</sup> =	0.9	0.88	0.9	0.9	0.91
Ecogenicidade (Pixels/mm <sup>2</sup> )	r <sup>2</sup> =	0.7	0.68	0.7	0.69	0.64
Escore de Tamanho (mm)	r <sup>2</sup> =	0.94	0.92	0.92	0.92	0.91

R<sup>2</sup>= coeficiente de correlação, todos os valores foram significativos P < 0,0001.

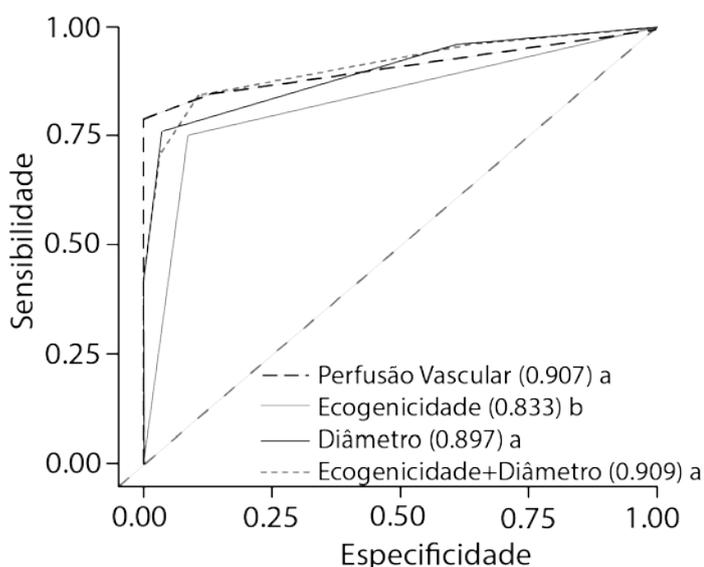
**Tabela 3.** Testes de confiança utilizando escores subjetivos como método de diagnóstico de gestação precoce em novilhas Nelores.

	Dia 33	Dia 21 - Doppler (escores)	Dia 21 - Ecogenicidade (escores)	Dia 21 - Tamanho (escores)	Dia 21 - Ecogenicidade + Tamanho (escores)
<b>Gestante</b>	235	304	306	306	271
<b>Vazia</b>	330	261	259	259	294
<b>Total</b>	565	565	565	565	565
<b>Sensibilidade</b>	-	100% <sup>a</sup>	91.9% <sup>b</sup>	96.6% <sup>b</sup>	93.2% <sup>b</sup>
<b>Especificidade</b>	-	79.1% <sup>ab</sup>	71.2% <sup>b</sup>	76.1% <sup>b</sup>	84.2% <sup>a</sup>
<b>VPP</b>	-	77.3% <sup>ab</sup>	72.5% <sup>b</sup>	74.2% <sup>ab</sup>	80.8% <sup>a</sup>
<b>VPN</b>	-	100% <sup>a</sup>	92.9% <sup>c</sup>	96.9% <sup>b</sup>	94.6% <sup>bc</sup>
<b>Acurácia</b>	-	87.8% <sup>a</sup>	82.1% <sup>b</sup>	84.6% <sup>ab</sup>	88% <sup>a</sup>

VPP= valor preditivo positivo, VPN= valor preditivo negativo, letras minúsculas diferentes indicam P<0,05.



**Figura 5.** Curvas Roc mostram a eficiência das avaliações objetivas de pixels coloridos, ecogenicidade /mm<sup>2</sup> e diâmetro do CL, letras minúsculas diferentes indicam P<0.05.



**Figura 6.** Curvas Roc mostram a eficiência dos escores subjetivos de vascularização, ecogenicidade, tamanho e tamanho + ecogenicidade. Letras minúsculas diferentes indicam P<0.05.

#### 4.4 Discussão

A contagem objetiva de pixels apresentou alta correlação com o diagnóstico de gestação realizado 33 dias pós-IA, sendo que esses resultados corroboram com estudos que avaliaram a funcionalidade do CL com escores de vascularização (Silva e Ginther, 2010). Outros pesquisadores mostraram que a avaliação subjetiva de porcentagem de área vascularizada do corpo lúteo está diretamente ligada à produção de progesterona, sendo assim, este se torna um método eficiente para diagnóstico de gestação precoce em fêmeas bovinas (Pugliesi et al., 2014; Scully et al., 2014). Avaliações do CL em diferentes fases do ciclo estral mostraram que a avaliação da perfusão vascular é uma ferramenta mais eficiente que as imagens no modo B para avaliar a funcionalidade do CL nas fases de desenvolvimento e regressão, entretanto, na fase ativa com maior produção de progesterona pelo CL, a

avaliação do diâmetro com ultrassom no modo B também apresenta correlação (Kastelic et al., 1990; Ginther, 2007; Herzog et al., 2010; Balaro et al., 2017).

As imagens foram realizadas 21 dias após as inseminações, logo, as novilhas estavam em diferentes condições fisiológicas de desenvolvimento ou manutenção do CL, entretanto discordando da literatura discutida no parágrafo anterior, o diâmetro do CL apresentou a maior correlação dos três parâmetros avaliados e a ecogenicidade também foi altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) com o DG realizado aos 33 dias, porém apresentou o menor valor de correlação.

Os valores objetivos de diâmetro e de perfusão vascular apresentaram 100% de valor preditivo negativo e especificidade e também tiveram mesma eficiência quando avaliados na curva ROC. A eficiência dos valores de ecogenicidade /mm<sup>2</sup> apresentou baixa eficiência, isso pode ser explicado devido ao seu menor coeficiente de correlação na regressão logística, mostrando que somente com esse parâmetro usado de forma objetiva é difícil de distinguir gestantes de vazias. A área sob a curva gerada com esse parâmetro foi significativamente inferior que os outros métodos objetivos ( $P < 0,05$ ).

A representação dos valores objetivos em escores foram testados utilizando cinco diferentes avaliadores, sendo que as avaliações subjetivas da vascularização do CL e os escores de tamanho e ecogenicidade propostos tiveram altas correlações com seus respectivos valores objetivos, e todos foram significativos ( $P < 0,0001$ ) com todos avaliadores (Tabela 1).

Recentemente, pesquisadores mostraram que apenas a avaliação do tamanho do CL apresentou acurácia de 82,8%, já com o modo Doppler, os autores relataram 88,3% (Guimarães et al., 2015). Nossos resultados discordam dos dados apresentados por estes autores já que a acurácia no modo B (ecogenicidade e tamanho) do presente trabalho foi similar à do modo Doppler (88 e 87,8%, respectivamente). A diferença entre os trabalhos pode ser devida às diferenças na metodologia, visto que, no presente estudo, além do tamanho do CL, foi levada em consideração a ecogenicidade. Pela análise da curva ROC, os escores de ecogenicidade, avaliados individualmente, apresentaram eficiência inferior, assim como nas avaliações objetivas. Outros pesquisadores relataram baixa acurácia (77,9%) para o diagnóstico de gestação aos 21 dias avaliando o CL no modo B. Entretanto, quando os autores inseriram um ponto de corte de 23mm no tamanho do CL, a acurácia foi de 85,8% (Bicalho et al., 2008). No presente estudo, se usarmos somente os resultados de tamanho do CL como parâmetro, a acurácia cai para 86,7%, semelhante aos autores citados. Isso mostra que a adição da avaliação de ecogenicidade foi importante para aumentar a acurácia do método. Os primeiros trabalhos utilizando a ultrassonografia no modo B apontavam uma acurácia de cerca 90% para realização de diagnósticos de gestação precoce a partir dos 20 dias pós IA em novilhas, entretanto, além da observação da presença do CL, os autores usavam como critério a presença ou não de fluido uterino (Kastelic et al., 1989; Kastelic et al., 1991).

Acreditamos que a ressincronização associada à estratégia de DG no dia da inseminação, provavelmente dois dias após a luteólise, pode beneficiar a eficiência dos escores no modo B. Estudos avaliando imagens ultrassonográficas do CL em luteólise mostraram que o Doppler é capaz de prever estágios iniciais da luteólise, entretanto no modo B, a diminuição do tamanho já é possível ser observada no segundo dia após a luteólise natural ou induzida (Ginther, 2007; Silva e Ginther, 2010; Pugliesi et al., 2014).

Apesar da eficiência de um método de diagnóstico precoce ser dado pela acurácia, o que baliza a eficiência do método é a ausência de diagnósticos falsos negativos ou positivos segundo o interesse do diagnóstico. No presente trabalho, é importante que uma fêmea que esteja prenha eventualmente não seja diagnosticada como não gestante, pois isso levaria a uma interpretação errada e eventualmente o técnico poderia interromper a gestação utilizando tratamentos farmacológicos exógenos acreditando que a fêmea não estivesse gestante. No diagnóstico baseado na perfusão vascular do CL, não foi observado aparecimento diagnóstico

falso negativo (0/261) já na avaliação baseada no tamanho e ecogenicidade do CL, houve incidência de 5,4% (16/294) ( $P= 0,0001$ ). Pesquisadores não observaram aparecimento de diagnósticos falso negativos realizados aos 21 dias de gestação utilizando a metodologia de avaliação de perfusão vascular do CL (Guimarães et al., 2015). Entretanto, outros autores relataram o aparecimento de diagnósticos falso negativos mesmo utilizando a ultrassonografia no modo Doppler (Siqueira et al., 2013; Scully et al., 2014).

O que pode explicar o fato dos escores subjetivos de tamanho não terem apresentados máxima sensibilidade é o fato da alta correlação entre diâmetro do CL e probabilidade de concepção, quando utilizamos um ponto corte fixo de 13mm de diâmetro e, considerando a mensuração objetiva do CL, o valor preditivo negativo e especificidade é 100%. Entretanto, de forma visual, não foi possível detectar essa mudança tênue no diâmetro do CL, sendo assim, houve dificuldade de replicar essa eficiência avaliando o tamanho com escores, como visto nos resultados subjetivos. Contudo, os resultados do presente trabalho mostram que a medida objetiva do CL mostrou máxima eficiência no valor preditivo negativo e na sensibilidade e, diferentes das outras medidas objetivas, essa tem uma resposta rápida e imediata no momento do diagnóstico de gestação podendo ser amplamente utilizada a campo.

A incidência de diagnósticos falsos positivos foi similar para diagnósticos baseados na perfusão vascular do CL ou pelo tamanho e ecogenicidade. Outros trabalhos relatam diferentes incidências de DG falso positivo (Pugliesi et al., 2014; Guimarães et al. 2015; Utt et al., 2009; Siqueira et al., 2013). Segundo os estudos que avaliaram o desempenho de métodos de diagnóstico de gestação precoce, essas grandes variações de falso positivo encontradas na literatura são devidas, principalmente, a três fatores: erro na operação do ultrassom (interpretação e calibragem do equipamento), animais que não sincronizaram na primeira IATF ou TETF e, principalmente, às perdas gestacionais iniciais, visto que entre os 20 a 30 dias de gestação, são um dos períodos de maior risco de perda gestacional e é grande a variação entre rebanhos e localidades diferentes (Scully et al., 2014; Wiltbank et al., 2016b; Pugliesi et al., 2017; Pugliesi et al., 2018).

O presente estudo permite as seguintes conclusões: i) as medidas objetivas de pixels coloridos e o diâmetro apresentaram mesma eficiência; ii) as metodologias de escores subjetivos apresentaram a mesma acurácia quando associado escore de tamanho e ecogenicidade; iii) O DG, baseado nos escores de tamanho e ecogenicidade, apresentou incidência significativa de DG falso negativos fazendo com que não seja interessante seu uso.

#### **4.5 Referências**

- Balaro, M.F.A., Santos, A.S., Moura, L.F.G., Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2017. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. *Theriogenology* 95, 118-126.
- Bicalho, R., Galvão, K., Guard, C., Santos, J., 2008. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 70, 199-207.
- Chebel, R.C., Santos, J.E., Cerri, R.L., Galvão, K.N., Juchem, S.O., Thatcher, W.W., 2003. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60, 1389-1399.
- Crepaldi, G., Freitas, B., Mingoti, R., Colli, M., Gonçalves Junior, W., Ferreira, R., Baruselli, P.S., 2017. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. *Animal Reproduction* 14, 698.

- De Tarso, S., Ishak, G., Gastal, G., Bashir, S., Gastal, M., Gastal, E., 2016. Novel prospects for evaluation of follicle wall blood flow using color-Doppler ultrasonography. *Anim. Reprod* 13, 762-771.
- Fricke, P.M., Ricci, A., Giordano, J.O., Carvalho, P.D., 2016. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 32, 165-180.
- Ginther, O.J., 2007. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography*, book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing.
- Green, J., Okamura, C., Poock, S., Lucy, M., 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- $\tau$ ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20 d after insemination in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 121, 24-33.
- Guimarães, C., Oliveira, M., Rossi, J., Fernandes, C., Viana, J., Palhao, M., 2015. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology* 84, 237-241.
- Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73, 691-697.
- Kastelic, J., Bergfelt, D., Ginther, O., 1990. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33, 1269-1278.
- Kastelic, J., Bergfelt, D., Ginther, O., 1991. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 35, 569-581.
- Kastelic, J., Curran, S., Ginther, O., 1989. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 31, 813-820.
- Martins, J., Wang, D., Mu, N., Rossi, G., Martini, A., Martins, V., Pursley, J., 2018. Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 101, 10505-10525.
- Matsui, M., Miyamoto, A., 2009. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *The Veterinary Journal* 181, 232-240.
- Penteado, L., Rezende, R., Mingoti, R., Colli, M., Sá Filho, M., Santos, F., Lemos Motta, J., Bayeux, B., Vieira, L., Baruselli, P.S., 2016. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. *Animal Reproduction* 13, 450.
- Pugliesi, G., de Melo, G.D., Jr, G.A.A., Pellegrino, C.A.G., Silva, J.B., Rocha, C.C., Motta, I.G., Vasconcelos, J.L.M., Binelli, M., 2018. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. *Anim. Reprod* 15, 239-246.
- Pugliesi, G., Miagawa, B.T., Paiva, Y.N., França, M.R., Silva, L.A., Binelli, M., 2014. 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* 91, 95, 91-12.
- Pugliesi, G., Rezende, R.G., Silva, J., Lopes, E., Nishimura, T.K., Baruselli, P.S., Madureira, E., Binelli, M., 2017. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 41, 140-150.
- Ricci, A., Carvalho, P., Amundson, M., Fourdraine, R., Vincenti, L., Fricke, P., 2015. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *Journal of dairy science* 98, 2502-2514.

- Sá Filho, M., Marques, M., Girotto, R., Santos, F., Sala, R., Barbuio, J., Baruselli, P., 2014. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology* 81, 284-290.
- Scully, S., Butler, S., Kelly, A., Evans, A., Lonergan, P., Crowe, M., 2014. Early pregnancy diagnosis on days 18 to 21 postinsemination using high-resolution imaging in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* 97, 3542-3557.
- Silva, L.A., Ginther, O., 2010. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction* 139, 453-463.
- Siqueira, L., Areas, V., Ghetti, A., Fonseca, J., Palhao, M., Fernandes, C., Viana, J., 2013. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of dairy science* 96, 6461-6472.
- Utt, M., Johnson Iii, G., Beal, W., 2009. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 71, 707-715.
- Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M.Z., Monteiro, P.L., Melo, L.F., Ochoa, J.C., Santos, J.E., Sartori, R., 2016b. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86, 239-253.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A nova proposta de Resynch para inseminações com intervalo de 21 dias em Nelore apresentou eficiência semelhante na incidência de DG-FP, nas taxas de ovulação e prenhez ao final da estação do que o Resynch24.

Análise objetiva de pixels teve a mesma eficiência do diâmetro do CL, entretanto somente escores de vascularização replicaram a eficiência da avaliação objetiva.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 759-767, 2003.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n., p. 127-140, 2004.

ACOSTA, T. J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 39-44, 2007.

ADAMS, G.; MATTERI, R.; GINTHER, O. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Reproduction**, v. 96, n. 2, p. 627-640, 1992.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; MCCRACKEN, J. A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5926-5940, 2016.

AYRES, H.; FERREIRA, R.; TORRES-JÚNIOR, J.; DEMÉTRIO, C.; SÁ FILHO, M.; GIMENES, L.; PENTEADO, L.; D'OCCHIO, M.; BARUSELLI, P. Inferences of body energy reserves on conception rate of suckled Zebu beef cows subjected to timed artificial insemination followed by natural mating. **Theriogenology**, v. 82, n. 4, p. 529-536, 2014.

BAEZ, G. M.; BARLETTA, R. V.; GUENTHER, J. N.; GASKA, J. M.; WILTBANK, M. C. Effect of uterine size on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1357-1366, 2016.

BARNABE, V. H.; MUCCIOLO, R. G.; BARNABE, R. C. Utilização da prostaglandina F2 alfa (PGF2 alfa) na sincronização do ciclo estral em bovinos. II. Inseminações artificiais praticadas em horários pré determinados, com observação de sintomas de cio. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 367-376, 1976.

BARTOLOME, J.; SOZZI, A.; MCHALE, J.; SWIFT, K.; KELBERT, D.; ARCHBALD, L.; THATCHER, W. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1643-1658, 2005.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.; MARQUES, M.; RODRIGUES, C.; NASSER, L.; SILVA, R.; REIS, E.; SÁ FILHO, M. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise Retrospectiva). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n., p. 228, 2004.

- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L.; DE 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., p. 558-571, 2017.
- BO, G.; ADAMS, G.; PIERSON, R.; MAPLETOFT, R. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995.
- BYERLEY, D.; STAIGMILLER, R.; BERARDINELLI, J.; SHORT, R. Pregnancy Rates of Beef Heifers Bred Either on Puberal or Third Estrus 1, 2. **Journal of animal science**, v. 65, n. 3, p. 645-650, 1987.
- CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; SMART, V.; RYAN, M.; MACMILLAN, K. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device for 7 or 8 d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24 h after removal. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 824-834, 2007.
- CHATE, S. C. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. (Tese), 2009.
- CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; 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.
- COUTO, S. R. B.; GUERSON, Y. B.; FERREIRA, J. E.; SILVA, O. R.; SILENCIATO, L. N.; BARBERO, R. P.; MELLO, M. R. B. Impact of supplementation with long-acting progesterone on gestational loss in Nelore females submitted to TAI. **Theriogenology**, v. 125, n., p. 168-172, 2019.
- CREPALDI, G.; FREITAS, B.; MINGOTI, R.; COLLI, M.; GONÇALES JUNIOR, W.; FERREIRA, R.; BARUSELLI, P. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. **Animal Reproduction**, v. 14, n., p. 698, 2017.
- CUTAIA, L.; VENERANDA, G.; TRIBULO, R.; BARUSELLI, P.; BÓ, G. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. **VSimposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba**, v. 27, n., p. 119-132, 2003.
- DISKIN, M.; WATERS, S.; PARR, M.; KENNY, D. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 83-93, 2016.
- DUNNE, L.; DISKIN, M.; SREENAN, J. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 39-44, 2000.
- FERREIRA, J. E. Impacto da IATF na estação de monta de fêmeas Nelores (*Bos taurus indicus*) com a utilização da eCG considerando o ECC e o padrão de ciclicidade após triagem ginecológica. (Tese), 2016.
- FERREIRA, R.; CONTI, T.; GONÇALVES, R.; SOUTO, L.; SALES, J. N. D. S.; SÁ FILHO, M. F. D.; ELLIFF, F. M.; BARUSELLI, P. S. Synchronization treatments previous to natural breeding anticipate and improve the pregnancy rate of postpartum primiparous beef cows. **Theriogenology**, v. 114, n., p. 206-211, 2018.

- FRICKE, P. Scanning the Future—Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle1. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 8, p. 1918-1926, 2002.
- FRICKE, P. M.; RICCI, A.; GIORDANO, J. O.; CARVALHO, P. D. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 32, n. 1, p. 165-180, 2016.
- GINTHER, O. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Cattle, Book 3. Cross Plains. v., n., p., 1998.
- GINTHER, O. Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography, book 4. **Cross Plains, WI: Equiservices Publishing**, v., n., p., 2007.
- GINTHER, O.; SILVA, L.; ARAUJO, R.; BEG, M. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.
- GINTHER, O.; RAKESH, H.; HOFFMAN, M. Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 304-311, 2014.
- GIORDANO, J.; FRICKE, P.; GUENTHER, J.; LOPES JR, G.; HERLIHY, M.; NASCIMENTO, A.; WILTBANK, M. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 3781-3793, 2012.
- GOMEZ-LEÓN, V.; GINTHER, O.; ARAUJO, E.; GUIMARÃES, J.; WILTBANK, M. Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics I: Comparison of follicle growth profiles under different physiological conditions in heifers. **Theriogenology**, v. 123, n., p. 194-201, 2019.
- GRAZZINI, E.; GUILLON, G.; MOUILLAC, B.; ZINGG, H. H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. **Nature**, v. 392, n. 6675, p. 509, 1998.
- GRILLO, G. F.; GUIMARÃES, A. L. L.; SOARES, J. R.; DE MELLO, M. R. B.; DA SILVA ALONSO, L.; FIGUEIREDO, M. A.; PALHANO, H. B. Efeito da triagem ginecológica sobre as taxas de concepção e gestação total de vacas Nelore submetidas a três protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 3, p. 250-254, 2015.
- GUIMARÃES, C.; OLIVEIRA, M.; ROSSI, J.; FERNANDES, C.; VIANA, J.; PALHAO, M. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 237-241, 2015.
- KASTELIC, J.; CURRAN, S.; GINTHER, O. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 31, n. 4, p. 813-820, 1989.
- KASTELIC, J.; BERGFELT, D.; GINTHER, O. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 569-581, 1991.
- LÜTTGENAU, J.; ULBRICH, S. E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, A.; HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 20-29, 2011.

- MCCRACKEN, J.; CUSTER, E.; SCHREIBER, D.; TSANG, P.; KEATOR, C.; AROSH, J. A new in vivo model for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF2 $\alpha$ . **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 97, n. 3-4, p. 90-96, 2012.
- MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 1-26, 2005.
- MOROTTI, F.; MORETTI, R.; DOS SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; CERQUEIRA, P. H. R.; SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, n., p. 170-177, 2018.
- MUNRO, R.; MOORE, N. Effects of progesterone, oestradiol benzoate and cloprostenol on luteal function in the heifer. **Journal of reproduction and fertility**, v. 73, n. 2, p. 353-359, 1985.
- NILES, A.; FRICKE, H.; CARVALHO, P.; WILTBANK, M.; HERNANDEZ, L.; FRICKE, P. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin 7 days after artificial insemination or at the time of embryo transfer on reproductive outcomes in nulliparous Holstein heifers. **Journal of dairy science**, v., n., p., 2019.
- PANCARCI, Ş.; ARI, U.; ATAKISI, O.; GÜNGÖR, Ö.; ÇİĞREMIŞ, Y.; BOLLWEIN, H. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 $\beta$  progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 9-15, 2012.
- PENTEADO, L.; REZENDE, R.; MINGOTI, R.; COLLI, M.; SÁ FILHO, M.; SANTOS, F.; LEMOS MOTTA, J.; BAYEUX, B.; VIEIRA, L.; BARUSELLI, P. Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization starting 14 or 22 days after prior FTAI. **Animal Reproduction**, v. 13, n., p. 450, 2016.
- PESSOA, G.; MARTINI, A.; CHAIBEN, M.; VIEIRA, L.; GIROTTO, R.; PUGLIESI, G.; SANTIN, T.; RUBIN, M.; BARUSELLI, P.; SÁ FILHO, M. Adjustment of the estradiol benzoate dose in the resynchronization protocol with unknown pregnancy status in suckled beef cows. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 610, p. 1-12, 2015.
- PINAFFI, F. L.; SANTOS, É. S.; SILVA, M. G. D.; MATURANA FILHO, M.; MADUREIRA, E. H.; SILVA, L. A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 470-476, 2015.
- PUGLIESI, G.; BEG, M.; CARVALHO, G.; GINTHER, O. Induction of PGFM pulses and luteolysis by sequential estradiol-17 $\beta$  treatments in heifers. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 492-506, 2012.
- 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, 91-12, 2014.
- PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n., p. 140-150, 2017.

PUGLIESI, G.; DE MELO, G. D.; JR, G. A. A.; PELLEGRINO, C. A. G.; SILVA, J. B.; ROCHA, C. C.; MOTTA, I. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; BINELLI, M. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 239-246, 2018.

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

SÁ FILHO, M.; GIMENES, L.; SALES, J.; CREPALDI, G.; MEDALHA, A.; BARUSELLI, P. IATF em novilha. **Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada**, v. 3, n., p. 54-67, 2008.

SÁ FILHO, M.; MARQUES, M.; GIROTTO, R.; SANTOS, F.; SALA, R.; BARBUIO, J.; BARUSELLI, P. 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.; CREPALDI, G.; GIROTTO, R.; SOUZA, A.; BARUSELLI, P. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1-2, p. 12-18, 2011.

SALES, J.; CARVALHO, J.; CREPALDI, G.; CIPRIANO, R.; JACOMINI, J.; MAIO, J.; SOUZA, J.; NOGUEIRA, G. D. P.; BARUSELLI, P. 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.

SANTOS, J. E. P.; SÁ FILHO, M. Nutrição e reprodução em bovinos. **Biotecnologias da Reprodução em Bovinos**, v. 2, n., p. 30-54, 2006.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.; GUENTHER, J.; PARRISH, J.; WILTBANK, M. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2803-2812, 2002.

SHIRASUNA, K.; ASAOKA, H.; ACOSTA, T. J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.; MATSUI, M.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Endothelin-1 within the corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow: local interaction with prostaglandin F2 $\alpha$  and angiotensin II. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 44, n., p. S252-255, 2004.

SIDDIQUI, M.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 113, n. 1-4, p. 287-292, 2009a.

SIDDIQUI, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; ALMAMUN, M.; BEG, M. A.; GINTHER, O. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. **Animal Reproduction**, v. 137, n. 4, p. 689-697, 2009b.

SPENCER, T. E.; HANSEN, T. R. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants. In: (Ed.). Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: **Springer**, 2015, p.105-135.

STEVENSON, J. S.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography

and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 475-483, 2003.

SUGIURA, T.; AKIYOSHI, S.; INOUE, F.; YANAGAWA, Y.; MORIYOSHI, M.; TAJIMA, M.; KATAGIRI, S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. **Journal of Reproduction and Development**, v., n., p. 2017-2139, 2018.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, n. 2, p. 93-107, 2001.

THATCHER, W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 $\beta$  on peripheral plasma concentration of 15-keto, 14-dihydro PGF $2\alpha$  and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745-756, 1986.

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.

UTT, M.; JOHNSON III, G.; BEAL, W. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 707-715, 2009.

VASCONCELOS, J.; PURSLEY, J.; WILTBANK, M. Effects of syncromate B combined with GnRH on follicular dynamics and time of ovulation. **Journal of animal science**, v. 72, n. Suppl 1, p. 174, 1994.

WILLIAMS, G. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of animal science**, v. 68, n. 3, p. 831-852, 1990.

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

WILTBANK, M. C.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M. Z.; MONTEIRO, P. L.; MELO, L. F.; OCHOA, J. C.; SANTOS, J. E.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 239-253, 2016.

WILTBANK, M.; MEIDAN, R.; OCHOA, J.; BAEZ, G.; GIORDANO, J.; FERREIRA, J.; SARTORI, R. Maintenance or regression of the corpus luteum during multiple decisive periods of bovine pregnancy. **Anim. Reprod**, v. 13, n. 3, p. 217-233, 2016b.

YAVAS, Y.; WALTON, J. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 25-55, 2000.