

CELINA ALVES DE OLIVEIRA

**REDUÇÃO DA DOSE DE CLOPROSTENOL SÓDICO EM PROTOCOLO DE IATF
EM VACAS CÍCLICAS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Domingos Guimarães

Coorientador: Jurandy Mauro Penitente Filho

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48r
2020

Oliveira, Celina Alves de, 1991-

Redução da dose de cloprostenol sódico em protocolo de
IATF em vacas cíclicas da raça Nelore / Celina Alves de
Oliveira. – Viçosa, MG, 2020.

43 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovinos. 2. Corpo lúteo. 3. Luteólise. 4. Progesterona.
5. Zebu. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação Medicina
Veterinária. II. Título.

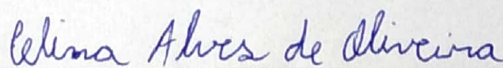
CDD 22. ed. 636.5082

**REDUÇÃO DA DOSE DE CLOPROSTENOL SÓDICO EM PROTOCOLO DE IATF
EM VACAS CÍCLICAS DA RAÇA NELORE**

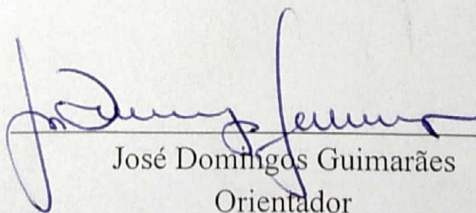
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Celina Alves de Oliveira
Autora



José Domingos Guimarães
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar minha mãe Iara, meu pai Edvaldo, minha irmã Cecília e meu irmão Guilherme. Obrigada mamis, por cuidar de mim com tamanha habilidade materna, zelar pela minha saúde, me fazer rir sempre que estamos juntas e fiscalizar pelo extrato se eu estava indo no RU. Meu pai (grande Urso), obrigada pela companhia, parceria, por tudo que gostamos em comum e fazemos juntos, por me ensinar coisas de mecânica e por sempre me dizer “não se preocupe com nada, só não bote fogo na casa”. Minha irmã, soul, agradeço por ser essa pessoa maravilhosa que você é comigo, por me emprestar suas coisas, por tudo que me ensinou e ensina e por ser minha segunda voz quando cantamos. Meu irmão Guizi, obrigada por sempre cuidar de mim, me defender, me fazer rir quando estou de volta em BH, e por cozinhar quando estamos sozinhos em casa.

Aos personagens de Viçosa, agradeço ao professor José Domingos por passar seus conhecimentos, ser uma pessoa extremamente paciente e assim, tornar muito agradáveis a convivência e as diversas viagens que fizemos. Meu coorientador Jura Jura, obrigada por sua ajuda, por sempre responder minhas perguntas intermináveis, por suas piadas engraçadas ou não e por tornar a sala do Jota um ambiente tão agradável todos os dias. Denise, Edgar, Paula, Faider, Lidi, Marquinhos e Saulo agradeço pela companhia e disponibilidade nesses dois anos. Dani, Dani, te agradeço toda a atenção, paciência e ajuda que sempre me deu. Meus grandes amigos Domingueiritas e Vivian, obrigada por me ajudarem tanto, me lembrarem do que eu não lembro e cuidarem tão bem de mim. Não sei mensurar quantas vezes perdi o fôlego de rir com vocês, e o quanto isso me fez bem. Seja em Florestal, na granja, na sala do Jota ou nas horas sem fim em que ficávamos batendo papo no RU até sermos expulsos, só tenho boas recordações e um agradecimento imensurável a vocês. Aos funcionários do hotel CEE, agradeço o cuidado e atenção que sempre tiveram comigo, em especial meu grande amigo Romeuzito, que tem o melhor papo da região e foi a minha melhor companhia ao longo desses dois anos tomando café com leite e comendo na recepção do hotel.

A toda equipe de Florestal (Libni, Rafael, Pitbull, Osmar, Osvaldo, Edmar, Edward, Sr. Silvio e Marco Antônio) agradeço a prestatividade que sempre tiveram, o bom humor com que sempre trabalhamos juntos e toda a ajuda que me deram durante o experimento.

Agradeço à Rosi, por ser sempre tão gentil, prestativa e tornar mais tranquila a vida de todos pós-graduandos.

Aos meus queridos amigos da UFMG e ao grupo Setor de RH (Fernanda, Aninha, Will, Lellão e Dayrell) obrigada a vocês pelos 10 anos de amizade, que é tão importante para mim, pelo apoio que sempre me dão, pelas risadas, pelas broncas, pelos áudios de 7 minutos e pelas conversas intermináveis sempre que nos encontramos. Meus grandes amigos Marcos e Bruno, agradeço a vocês pelos nossos tão sinceros e valiosos 15 anos de amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

OLIVEIRA, Celina Alves de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Redução da dose de cloprostenol sódico em protocolo de IATF em vacas cíclicas da raça Nelore.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientador: Jurandy Mauro Penitente Filho.

Objetivou-se avaliar a eficiência da redução da dose do análogo da prostaglandina $F_{2\alpha}$ (cloprostenol) em promover completa luteólise em vacas cíclicas da raça Nelore. Sessenta e oito vacas pluríparas foram avaliadas ao longo de três protocolos de IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) e foram aleatoriamente divididas em 2 tratamentos: Dia 0 (D0) = colocação de dispositivo intravaginal contendo 1 grama de progesterona (P4) + aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE); Dia 8 (D8) = retirada do dispositivo intravaginal de P4 + 0,250 mg de cloprostenol (Tratamento 0,250 mg) ou 0,500 mg de cloprostenol (Tratamento 0,500 mg); Dia 9 (D9) = 1 mg de BE; Dia 10 (D10) = inseminação artificial. Mensurações dos diâmetros foliculares e detecção das ovulações foram realizadas por avaliações ultrassonográficas diárias a partir do momento imediatamente antes da retirada do dispositivo de P4 até 72 horas após a retirada do mesmo (0, 24, 48 e 72 horas). Amostras de sangue de 40 vacas (29 ovuladas e 11 não ovuladas) foram obtidas para dosagem de P4 por radioimunoensaio. Os valores médios do diâmetro do folículo pré-ovulatório, a taxa de crescimento folicular e a taxa de ovulação não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos 0,500 mg e 0,250 mg. O diâmetro folicular nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas foi maior nas vacas ovuladas do que nas não ovuladas ($P < 0,05$). Considerando todas as vacas (ovuladas e não ovuladas), a concentração de P4 não diferiu entre os tratamentos a partir do tempo 48h. As vacas submetidas ao tratamento 0,250 mg apresentaram queda mais lenta das concentrações de P4, porém suficiente para promover luteólise funcional completa. Desse modo, a dose de 0,250 mg de cloprostenol pode ser recomendada para uso em protocolo de IATF, por promover a regressão funcional completa do corpo lúteo e não comprometer a ovulação.

Palavras-chave: Bovino. Corpo lúteo. Luteólise. Progesterona. Zebu

ABSTRACT

OLIVEIRA, Celina Alves de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Dose reduction of cloprostenol sodium in FTAI protocol in Nellore cyclic cows.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-adviser: Jurandy Mauro Penitente Filho.

This study investigated the efficiency of a reduced dose of prostaglandin $F_{2\alpha}$ analogue (cloprostenol) in the complete luteolysis of cyclic Nellore cows. Sixty eight pluriparous cows were evaluated over 3 FTAI protocols and were randomly divided into 2 treatments: Day 0 (D0) = intravaginal device containing 1 g progesterone insertion + intramuscular (IM) administration of 2 mg estradiol benzoate (EB); Day 8 (D8) = intravaginal device withdrawal + 0.250 mg cloprostenol (0.250 mg treatment) or 0.500 mg cloprostenol (0.500 mg treatment); Day 9 (D9) = 1 mg EB; Day 10 (D10) = artificial insemination. The measurement of follicle diameter and the ovulation detection were performed by daily ultrasonography from the moment immediately before progesterone (P4) device withdrawal until 72 hours after (0, 24, 48 and 72h). Blood samples of 40 cows (29 ovulated and 11 non-ovulated) were obtained daily for P4 assay by radioimmunoassay. The mean values of the preovulatory follicle diameter, the follicular growth rate and the ovulation rate did not differ between the 0.500 mg and 0.250 mg treatments ($P > 0.05$). The follicular diameter at 0, 24, 48 and 72h was larger in ovulated than in non-ovulated cows ($P < 0.05$). Considering all the cows (ovulated and non-ovulated), P4 concentration did not differ between treatments from 48 h. The 0.250 mg treatment showed a slower decrease in P4 levels, but it was still able to promote complete functional luteolysis. Thus, the dose of 0.250 mg of cloprostenol can be recommended for use in the FTAI protocol, as it promotes complete functional regression of corpus luteum without compromising ovulation.

Keywords: Bovine. Corpus luteum. Luteolysis. Progesterone. Zebu cattle

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1. Diameter of preovulatory follicle of cyclic Nelore cows submitted to 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol of overall and each FTAI.....	31
Figure 2. F1 growth rate of cyclic Nelore cows submitted to 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol in overall and each FTAI.	31
Figure 3. Relationship between follicular diameter at the moment of withdrawal device progesterone (0h) and the probability of ovulation of cyclic Nelore cows at FTAI.	33
Figure 4. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of cyclic Nelore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol.....	34
Figure 5. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of ovulated cyclic Nelore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol.....	35
Figure 6. Difference between log values of the progesterone levels from time 0h (Day 8 of FTAI protocol)	35
Figure 7. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of non-ovulated cyclic Nelore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol.	36
Figure 8. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of ovulated and non-ovulated cyclic Nelore cows regardless treatment (0.500 or 0.250 mg of cloprostenol) in FTAI protocol.....	36

LISTA DE TABELAS

Table 1. Ovulation rate of cyclic Nellore cows treated with 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol in overall and each FTAI.	31
Table 2. Diameter of F1 at 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal in each FTAI of cyclic Nellore cows submitted to 0.500 or 0.250 mg of cloprostenol.	32
Table 3. Diameter of F1 at 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal in each FTAI of ovulated and non-ovulated cyclic Nellore cows.....	33

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 Ciclo estral.....	10
1.2 Desenvolvimento folicular	11
1.3 Ovulação.....	12
1.4 Luteogênese.....	12
1.5 Luteólise	13
1.6 Prostaglandina F2 α : descoberta e estrutura química	14
1.7 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	125
1.8 Concentrações de progesterona no ciclo estral	125
1.9 Uso da prostaglandina F2 α na luteólise	16
1.10 Importância da luteólise completa na IATF	16
1.11 Redução da dose de PGF2 α	17
REFERÊNCIAS	18
Dose reduction of prostaglandin F2 α analogue (cloprostenol) in FTAI protocol in Nellore cyclic cows	25
ABSTRACT	26
2 INTRODUCTION	26
3 MATERIALS AND METHODS	27
3.1 Animals and Ethics.....	27
3.2 Experimental design	28
3.3 Measurement of follicle diameter and ovulation detection.....	28
3.4 Blood sampling and progesterone assay	28
3.5 Statistical analyses.....	29
4 RESULTS.....	30
4.1 Follicular evaluation.....	30
4.2 Plasma progesterone concentration during 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal.....	34
5 DISCUSSION	36
6 CONCLUSIONS	39
ACKNOWLEDGMENTS	39
REFERENCES	39

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Ciclo estral

Ciclo estral é definido como o período compreendido entre dois estros consecutivos de um mesmo animal, sendo contínuo e ocorrendo em intervalos regulares, com duração média de 21 dias (18-24 dias) na fêmea bovina que apresenta adequado estado nutricional e de saúde (BINELLI et al., 2001). Este ciclo resulta da interação coordenada entre o sistema nervoso central (hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário), gônadas e útero, sendo que esta interação ocorre, principalmente, pela ação dos seguintes hormônios: GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas (hipotálamo); FSH – hormônio folículo estimulante e LH – hormônio luteinizante (hipófise); E2 – estrógeno e P4 – progesterona (ovários) e PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α} (útero) (FERREIRA, 2010).

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases distintas (fases folicular e luteal), de acordo com as estruturas presentes nos ovários durante cada fase do ciclo. A fase folicular vai da regressão do corpo lúteo (CL) até a ovulação e é dividida em proestro e estro. O período de proestro (duração de 2 a 3 dias) é caracterizado pelo declínio da concentração de progesterona, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento da concentração de estradiol no sangue. O período de estro ou cio dura, em média, de 12 a 18 horas. É o único período em que a vaca permite ser montada pelo touro ou por outras vacas. No estro, um folículo maduro no ovário (folículo dominante) produz grandes quantidades de E2, responsáveis pelos sinais físicos e comportamentais típicos dessa fase. Ademais, sob a baixa concentração de P4, os elevados níveis de E2 induzem o aumento da frequência dos pulsos de GnRH que, por sua vez, desencadeiam o pico pré-ovulatório de LH. O metaestro (duração média de 3 dias) possui como evento principal a ovulação, na qual o oócito é liberado e ocorre a formação do corpo hemorrágico, e desenvolvimento do CL, responsável pela produção de P4. O diestro (duração de 12 a 15 dias) é a fase na qual há predominância de P4, sendo a concentração plasmática deste hormônio indicadora da funcionalidade do CL. No caso de fêmeas que não ficam gestantes, ao final do diestro ocorre a regressão do CL (luteólise) e redução dos níveis circulantes de P4 (FERREIRA, 2010; PFEIFER; FERREIRA, 2017).

1.2 Desenvolvimento folicular

A foliculogênese é dividida nas fases pré-antral e antral. A fase pré-antral compreende os folículos primordiais, primários e secundários, e é regulada predominantemente por fatores intra-ovarianos, como fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento fibroblástico (FGF), dentre outros. Nesta etapa, os folículos são totalmente independentes das gonadotrofinas FSH e LH. Já a fase antral é caracterizada pelo crescimento dos folículos secundários até o estágio pré-ovulatório. Neste caso, há dependência das gonadotrofinas FSH e LH, estimulando a esteroidogênese e o recrutamento de uma onda folicular (MAGALHÃES et al., 2012; MELLO et al., 2013). O desenvolvimento folicular de bovinos é caracterizado por um padrão de ondas de crescimento folicular (OF), no qual um pool de folículos cresce e regride sucessivamente e, na maioria das vezes, somente um folículo ovula na última OF do ciclo estral. Cada OF é caracterizada pelas fases de recrutamento, seleção, dominância e atresia ou ovulação do folículo dominante (FD). O recrutamento é definido como a emergência simultânea de folículos de 4 mm de diâmetro, a partir de um pool de folículos menores, estimulados pelo aumento da concentração de FSH. A seleção (ou divergência) ocorre a partir do início da diferença entre as taxas de crescimento dos dois maiores folículos, cerca de 2,5 dias após a emergência folicular (BEG et al., 2001). Dessa forma, o maior folículo torna-se o FD, enquanto os outros, chamados de folículos subordinados (FS) sofrem atresia e regredem (BERISHA; SCHAMS, 2005). A capacidade do FD continuar seu crescimento enquanto os FS regredem está relacionada à diversos fatores, como a maior disponibilidade de IGF-1 livre pela ação da PAPP-A (proteína plasmática A associada à prenhez) e queda dos níveis de FSH causada pelo estrógeno e pela inibina produzidos pelo FD, uma vez que mesmo baixas concentrações de FSH são suficientes para que o FD continue seu crescimento. Além disso, a alta responsividade do FD ao FSH é associada ao aumento do fluxo sanguíneo e aquisição de receptores de LH nas células da granulosa do FD. Caso a P4 produzida pelo CL se mantenha alta, o FD irá regredir, permitindo aumento da concentração de FSH e induzindo um novo recrutamento de folículos. (FORTUNE, 1994). Entretanto, quando a regressão do CL ocorre durante a fase de crescimento ou início de dominância, o FD continua seu desenvolvimento até um diâmetro pré-ovulatório, podendo ovular (KASTELIC; KNOFF; GINTHER, 1990).

Em animais *Bos taurus indicus*, o folículo ovulatório atinge, em média, diâmetro de 10-12 mm, enquanto em *Bos taurus taurus*, os valores são maiores, por volta de 16-20 mm (SARTORI; BARROS, 2011). Em animais da raça Holandesa, Wolfenson et al. (2004) demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral.

Avaliando a dinâmica folicular em rebanho da raça Nelore, Figueiredo et al. (1997) observaram predominância de 2 ondas foliculares em vacas (83,3%) e 3 ondas em novilhas (64,7%). Entretanto, em bovinos ocorrem variações no número de ondas foliculares entre os animais, no mesmo animal e entre raças, podendo ser observadas de uma a quatro ondas foliculares (ALVES et al., 2002). Tais variações podem ocorrer em função de vários fatores, como manejo, dieta, período de lactação, produção de leite e pós-parto imediato (GINTHER et al., 1996).

1.3 Ovulação

Sob baixas concentrações de P4 devido à regressão luteal, a alta concentração de estrógeno produzido pelo folículo pré-ovulatório induz maior frequência e amplitude dos pulsos de liberação de GnRH hipotalâmico, e consequente surgimento do pico da concentração de LH, responsável pela ovulação (FERREIRA, 2010). A ação do LH no folículo pré-ovulatório leva a um aumento dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 . Esse aumento é mediado por peptídeos vasoativos que promovem elevação do fluxo sanguíneo ovariano. Em relação à P4, seus níveis no fluido folicular aumentam antes mesmo da ovulação, uma vez que sua conversão em testosterona é inibida. A P4 tem papel importante no processo ovulatório, estimulando a atividade da colagenase, que, juntamente com o aumento dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ atuam na ruptura da parede folicular. Além disso, a PGE_2 ativa o plasminogênio em plasmina, enzima que atua na degradação do coágulo do corpo hemorrágico e na remodelação do folículo, resultando na formação do corpo lúteo (ACOSTA et al., 1999; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

1.4 Luteogênese

O corpo lúteo é uma estrutura ovariana formada a partir de um folículo ovulado (luteogênese), composto por células heterogêneas, das quais dois tipos de células esteroideogênicas fazem parte: as células luteais grandes (CLG) e as pequenas (CLP), que se originam, respectivamente, das células da granulosa e das células da teca interna do folículo rompido (SKARZYNSKY; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008).

Classificado como uma glândula endócrina temporária, o CL tem como função principal a secreção de progesterona, hormônio responsável pelo estabelecimento e manutenção da gestação nos animais domésticos (SIQUEIRA et al., 2009). As CLP são estimuladas pelo LH e são responsáveis por cerca de 20% da produção de P4 pelo CL. Já as CLG são responsáveis por cerca de 80% da produção de P4 e não são responsivas ao LH. A produção de

P4 é caracterizada pelo aumento da expressão de enzimas envolvidas na conversão do colesterol em progesterona (P450_{scc} e 3 β HSD) e pela diminuição da expressão das enzimas responsáveis pela conversão da progesterona em androstenediona (P450 17 α -hidroxilase) e estradiol (aromatase) (BERTAN et al., 2006; PFEIFER; FERREIRA, 2017). A capacidade de produção e desenvolvimento do CL é dependente do fluxo sanguíneo, uma vez que fatores de crescimento, fatores angiogênicos e substâncias vasoativas dão suporte à produção de P4 (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

1.5 Luteólise

No caso de ausência de fertilização ou incapacidade do conceito em sinalizar sua presença no útero, o CL regride, evento denominado luteólise, o qual é necessário para a ocorrência de um novo ciclo estral (DESTRO et al., 2014). A luteólise é caracterizada pela queda da secreção de P4 (luteólise funcional), seguida pelo remodelamento estrutural e redução do volume luteal (luteólise estrutural) (BOGAN et al., 2008).

A síntese de PGF_{2 α} nas células endometriais e, conseqüente luteólise, resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada (BERTAN et al., 2006). A contínua exposição uterina à progesterona leva a um mecanismo de downregulation sobre seus receptores por volta do 11º dia do ciclo estral, permitindo o aumento da expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina. A ação do estrógeno proveniente dos folículos estimula a produção de ocitocina pelo hipotálamo e o aumento de receptores de ocitocina no endométrio. Com isso, há produção de baixas concentrações de PGF_{2 α} , mas suficientes para promover retroalimentação positiva para a liberação de ocitocina pelo CL. Assim, a ocitocina luteal estimula maior liberação de PGF_{2 α} pelo endométrio, o qual age no CL, resultando em sua destruição funcional e estrutural (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; SILVIA et al., 1991).

Durante a luteólise, a queda de P4 ocorre devido a uma série de fatores, como perda de receptores de LH nas células luteais, diminuição do transporte de colesterol para o citoplasma e mitocôndrias, redução do fluxo sanguíneo pela ação de substâncias vasoativas (endotelina-1, angiotensina II) e indução de apoptose por células do sistema imune (BERISHA; SCHAMS, 2005; PINAFFI; ARAUJO; GINTHER, 2018; TREVISOL et al., 2013).

Na espécie bovina, a artéria ovariana apresenta-se enovelada à veia útero-ovariana. Essa conformação permite a existência de um mecanismo contracorrente que permite a passagem da PGF_{2 α} produzida pelo endométrio para o ovário de forma direta. Dessa forma, a

PGF_{2α} promove sua ação luteolítica no CL sem passar pela circulação sistêmica (MAPLETOFT; DEL CAMPO; GINTHER, 1976; MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999).

Durante o ciclo estral, a concentração plasmática de P4 apresenta variação cíclica e reflete a funcionalidade do CL nas fases de crescimento, manutenção e regressão. Concentrações abaixo de 1 ng/mL são verificadas ao estro, elevando-se até por volta do décimo dia, quando alcançam valores máximos de 5,3 ng/mL em vacas de aptidão leiteira em lactação e 4,6 ng/mL em vacas da raça Nelore (BORGES et al., 2003; TAYLOR; RAJAMAHENDRAN, 1991). Caso não ocorra gestação, o CL regride e as concentrações de P4 reduzem até valores compatíveis para a manifestação de novo estro. No caso dos valores de P4 presentes na regressão luteal, Mann e Lamming (2006) e Ginther et al. (2010) consideraram o começo da luteólise ocorrendo a partir do início de um declínio da concentração de P4 até o valor de 1 ng/mL.

1.6 Prostaglandina F_{2α}: descoberta e estrutura química

Von Euler (1935) foi o primeiro a identificar o princípio ativo dos efeitos da prostaglandina no miométrio, denominando-a ao detectá-la no líquido seminal de carneiros, possivelmente secretada pela próstata e sendo o sufixo “glandina” associado à glândula (BERGSTROM, 1967). Na década de 70, trabalhos demonstraram que a PGF_{2α} é a luteolisina natural do útero em espécies como bovina e ovina, o que levou ao uso de PGF_{2α} exógena para induzir regressão do CL, com consequente ocorrência de cio e avaliação da fertilidade (LAUDERDALE et al., 1974; MCCRAKEN; GLEW; SCARAMUZZP, 1970). Atualmente, as prostaglandinas e seus análogos sintéticos (dinoprost, cloprostenol) são aplicados em diversos protocolos hormonais com a finalidade de reduzir a fase luteal, sendo amplamente utilizados em diferentes técnicas reprodutivas. Dentre elas, tem-se: IATF, TE (transferência de embriões) e PIVE (produção *in vitro* de embriões).

As prostaglandinas são ácidos graxos hidroxilados e fazem parte de um grupo chamado eicosanoides, derivados do ácido araquidônico. São moléculas de 20 átomos de carbono contendo um anel ciclopentano com duas cadeias laterais de carbono adjacentes. De acordo com sua estrutura, as prostaglandinas naturais são divididas em 5 grupos, denominados pelas letras A, B, C, E e F. Tal classificação depende da disposição dos grupos hidroxila e/ou cetona e das ligações duplas no anel ciclopentano. Além disso, o número de ligações duplas nas cadeias laterais de carbono é indicado por um sufixo numérico (CRAIG, 1975). Dessa forma, o sufixo “2” na PGF_{2α} indica a presença de duas ligações duplas. Em condições normais, as

prostaglandinas possuem uma meia-vida e uma concentração no sangue muito baixas, devido a sua grande sensibilidade à oxidação, que ocorre no pulmão (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999).

1.7 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

Dentre as principais biotécnicas utilizadas para melhoria dos índices reprodutivos, encontram-se a Inseminação Artificial (IA) e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). A deposição do sêmen no órgão reprodutor feminino por método artificial apresenta diversas vantagens, como melhoramento genético do rebanho, prevenção de doenças sexualmente transmissíveis, utilização do sêmen de raças que não são adaptadas ao clima tropical e padronização do rebanho (EMBRAPA, 2016). Apesar da forte expressão no mercado mundial, a pecuária de corte brasileira apresenta eficiência reprodutiva insatisfatória, demonstrada pelo elevado intervalo de partos, principalmente em sistemas extensivos (BERGAMASCHI; MACHADO; BARBOSA, 2010; BARBOSA et al., 2015).

Dentro deste contexto, a IATF se mostra uma forte opção, promovendo o controle do ciclo estral da fêmea bovina pelo uso de fármacos em dias pré-determinados. A eliminação da detecção de cio, otimização da mão de obra e concentração das inseminações e partos em épocas desejáveis são alguns dos benefícios da técnica (FERREIRA, 2017). Segundo Baruselli et al. (2019), entre os anos de 2008 e 2018, a porcentagem das inseminações que foram realizadas por meio da IATF cresceu de 31,7% para 86,3%, o que demonstra o forte poder de expansão da técnica.

Os programas de IATF seguem a seguinte lógica: 1) Sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, seja por indução da ovulação (GnRH) ou por indução de atresia folicular (associação entre P4 e E2); 2) Controlar a duração da fase progesterônica, através do uso de agentes luteolíticos (PGF_{2α} e estrógenos) ou pela administração exógena de P4 por meio de dispositivo de liberação lenta; 3) Induzir a ovulação sincronizada do folículo dominante ao final do tratamento com GnRH, LH, hCG ou estrógenos (valerato de estradiol – VE, cipionato de estradiol - CE ou benzoato de estradiol - BE) (TORRES-JÚNIOR et al., 2016).

1.8 Concentrações de progesterona no ciclo estral

Ao longo do ciclo estral, as concentrações médias de P4 plasmática variam de acordo com o momento do ciclo, sendo menores que 1 ng/mL 1 dia antes do estro até 2 a 3 dias após o estro (ADEYEMO; HEATH, 1980). Tem sido demonstrado que esses valores atuam

influenciando a resposta do animal à IATF, uma vez que uma baixa concentração de P4 plasmática, advinda de uma regressão luteal eficiente, é necessária para a ovulação do folículo dominante (MENEGETTI et al., 2009; PERES et al., 2009).

1.9 Uso da prostaglandina $F_{2\alpha}$ na luteólise

A eficiência da $PGF_{2\alpha}$ em lisar o CL depende da presença de um CL responsivo ao tratamento, o que acontece do 5º ao 16º dia do ciclo estral, com eficiência máxima de sincronização após o 9º dia. O cio vai ocorrer de 2 a 7 dias após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$ (FERREIRA, 2010). Esta variação de tempo para o surgimento do cio depende do estágio de desenvolvimento do FD no momento do tratamento. Caso ele esteja nas fases estática final ou de regressão, será necessário maior tempo até que o folículo da nova onda se desenvolva e se torne ovulatório (BÓ et al., 1994; KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990). Assim, como a $PGF_{2\alpha}$ sozinha não sincroniza o cio de maneira precisa e também não sincroniza o momento da ovulação, faz-se necessária a inclusão de outros hormônios (indutores de ovulação, como BE, CE ou GnRH) após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$, para que a ovulação seja sincronizada, o que permitirá a realização da inseminação artificial em dia pré-determinado (FERREIRA, 2010). No Brasil, a indução da ovulação pela administração de BE ou CE é a mais comumente utilizada na IATF, sendo feita no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 ou após 24 horas. O CE possui maior meia-vida que o BE, promovendo assim um menor pico de 17β -estradiol, que dura mais tempo e surge mais tardiamente. Apesar de suas diferentes características farmacocinéticas, os dois ésteres de estradiol apresentam eficiência semelhante quanto à indução e sincronização da ovulação e taxa de concepção (CREPALDI, 2009; MELO et al., 2016).

No caso dos protocolos de IATF baseados na associação de P4 e E2 no início do protocolo (Dia 0), a administração da $PGF_{2\alpha}$ é realizada no momento da retirada do dispositivo de P4 ou até 48 horas antes (MENEGETTI et al., 2009).

1.10 Importância da luteólise completa na IATF

Além de um adequado ambiente de alta concentração de P4 durante o crescimento folicular, a redução eficiente da P4 circulante conforme se aproxima o momento da ovulação e da fecundação parece ser um fator determinante para fertilização e concepção. A baixa concentração de P4 próximo ao momento da IA são promovidos pela ocorrência de adequada luteólise. Caso isso não ocorra de forma eficiente, pode haver comprometimento dos índices de

fertilidade. Este problema pode ser observado tanto em programas de sincronização de ovulação para IATF quanto em programas de inseminação baseado na observação de estro (NASCIMENTO et al., 2013).

Estudos demonstraram que mesmo um pequeno aumento na concentração de P4 observado na ocasião do estro, é inversamente proporcional aos índices de concepção (KENYON et al., 2013; WALDMANN et al., 2001). Vacas com menor concentração de P4 (0,2 ng/mL, em média) próxima ao momento da IA apresentaram 50% de taxa de concepção ao serem inseminadas, enquanto vacas com maior concentração de P4 (0,8 ng/mL, em média) próxima do momento da IA apresentaram taxa de concepção de 20% (DE SILVA et al., 1981).

Os problemas que provocam elevadas ou não suficientemente reduzidas concentrações de P4 no período próximo a IA vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos. Moreira et al. (2000) encontraram 19% de vacas com luteólise incompleta ao avaliarem a regressão luteal 48 horas após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esses animais apresentaram menor taxa de prenhez e maior perda gestacional comparando-se com as vacas que apresentaram luteólise completa. Maiores concentrações de P4 próximas ao momento da IA estão relacionadas a um ambiente inadequado na tuba uterina e no útero, prejudicando a fertilização e o desenvolvimento embrionário (HUNTER, 2005; SOUZA et al., 2011). Além disso, falhas na regressão luteal, e consequente concentração de P4 não suficientemente reduzida pode afetar o padrão dos pulsos de LH, prejudicando a maturação oocitária (MOREIRA et al., 2000; RAHE et al., 1980).

1.11 Redução da dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$

Diferentes propostas de redução da dose convencional dos análogos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram testadas nos últimos anos. A utilização de 50% da dose convencional via IM se mostrou eficiente em promover luteólise completa e indução de estro. Já a via intravulvosubmucosa foi eficiente até mesmo com o uso de 25% da dose convencional de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ALVAREZ et al., 1991; HORTA et al., 1986; MEIRA et al., 2006). A resposta luteolítica à $\text{PGF}_{2\alpha}$ se mostra dependente da dose utilizada e do estágio de vida que o CL se encontra, havendo menor resposta em CL de fase inicial (BERARDINELLI; ADAIR, 1989; VALLDECABRE-TORRES et al., 2012).

Na realização da IATF, os valores gastos com fármacos representam, em média, 33% do custo total, considerando os gastos com hormônios, dose de sêmen e prestação do serviço médico veterinário (BARUSELLI, 2019). Os análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ representam um valor significativo no custo do protocolo empregado (D0: BE + dispositivo intravaginal de P4; D8:

retirada do dispositivo de P4 + PGF_{2α}; D9: BE; D10: IA), podendo variar entre 35 a 57% dependendo do produto escolhido. Dessa forma, a proposta de redução da dose utilizada representa importante redução de custos, e consequente maior margem de lucro para o produtor.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide systemin bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1419–1425, dez. 1999.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127–140, jul. 2004.

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos taurus and Bos indicus heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411–420, 1 dez. 1980.

ALVAREZ, R. H. et al. The use of lower doses of the prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 25, n. 2, p. 93–96, 1 jun. 1991.

ALVES, N. G. et al. Atividade Ovariana em Fêmeas Bovinas da Raça Holandesa e Mestiças Holandês x Zebu, Durante Dois Ciclos Estrais Normais Consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 627–634, 2002.

BARBOSA, F. A. et al. **Cenários para a pecuária de corte amazônica**. Belo Horizonte: Editora IGC / UFMG, 2015.

BARUSELLI, P. S. et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 308–314, 2019.

BARUSELLI, P.S. IATF gera ganhos que superam R\$ 3,0 bilhões nas cadeias de carne e de leite. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, 2. ed., 2019. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 10 janeiro 2020.

BEG, M. A. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 432–441, fev. 2001.

BEG, M. A. et al. Follicle Selection in Cattle: Dynamics of Follicular Fluid Factors During Development of Follicle Dominance. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 120–126, 1 jan. 2002.

BERARDINELLI, J. G.; ADAIR, R. Effect of prostaglandin F₂α dosage and stage of estrous cycle on the estrous response and corpus luteum function in beef heifers. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 301–314, ago. 1989.

BERGAMASCHI, M. A. C. M.; MACHADO, R.; BARBOSA, R. T. **Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras**. São Carlos: Embrapa, 2010.

BERGSTRÖM, S. Prostaglandins: members of a new hormonal system. These physiologically very potent compounds of ubiquitous occurrence are formed from essential fatty acids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 157, n. 3787, p. 382–391, 28 jul. 1967.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 305–317, ago. 2005.

BERTAN, C. M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824, 1 dez. 2006.

BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451–1463, 1 dez. 2001.

BÓ, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555–1569, 1 jan. 1994.

BOGAN, R. L. et al. Prostaglandin Synthesis, Metabolism, and Signaling Potential in the Rhesus Macaque Corpus Luteum throughout the Luteal Phase of the Menstrual Cycle. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5861–5871, nov. 2008.

BORGES, Á. M. et al. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 85–92, fev. 2003.

CRAIG, G. M. Prostaglandins in reproductive physiology. **Postgraduate Medical Journal**, v. 51, n. 592, p. 74–84, fev. 1975.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 14 set. 2009.

DE SILVA, A. W. M. V. et al. Interrelationships With Estrous Behavior and Conception in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 12, p. 2409–2418, 1 dez. 1981.

DESTRO, F. C. et al. Atuação do interferon-tau no reconhecimento materno da gestação. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 9, n. 2, p. 338–347, 2014.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina. Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1 ed. Juiz de Fora: Editar, 2010.

FERREIRA, Lucas F. V. **Taxa de gestação de fêmeas Nelore confinadas, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo**. 2017. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489–1505, jun. 1997.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225–232, fev. 1994.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–1194, dez. 1996.

GINTHER, O. J. et al. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F 2 α and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. **Theriogenology**, v. 74, n. 7, p. 1179–1186, 15 out. 2010.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223–230, set. 1989.

HORTA, A. E. et al. Possibility of reducing the luteolytic dose of cloprostenol in cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 25, n. 2, p. 291–301, fev. 1986.

HUNTER, R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 45, n. 3, p. 281–290, jun. 2005.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin F₂ α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, n. 3, p. 169–180, 1 nov. 1990.

KENYON, A. G. et al. Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 223–230, 30 jan. 2013.

KING, M. E. et al. Effect of stage of the estrous cycle on interval to estrus after PGF(2 α) in beef cattle. **Theriogenology**, v. 18, n. 2, p. 191–200, ago. 1982.

LAUDERDALE, J. W. et al. Fertility of cattle following PGF₂ α injection. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 964–967, maio 1974.

MAGALHÃES, D. M. et al. Hormônio do Crescimento (GH) e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I): importantes reguladores da foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 32–38, 2012.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Timing of prostaglandin F₂ α release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3, p. 328–336, 1 jul. 2006.

MAPLETOFT, R. J.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J. Local Venoarterial Pathway for Uterine-Induced Luteolysis in Cows. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 153, n. 2, p. 289–294, 1 nov. 1976.

MARQUES, V. B. et al. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 4, p. 479–488, 2007.

MARTINS, J. P. N. et al. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F₂ α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2815–2824, jun. 2011.

MARTINS, J. P. N.; POLICELLI, R. K.; PURSLEY, J. R. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2806–2814, jun. 2011.

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

MCCRACKEN, J. A.; GLEW, M. E.; SCARAMUZZP, R. J. Corpus Luteum Regression Induced by Prostaglandin F2 α . **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 544–546, 1 abr. 1970.

MEIRA, C. et al. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin F2 α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 7, n. 4, p. 387–390, dez. 2006.

MELLO, R. R. C. et al. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. v. 37, n. 4, p. 328–333, 2013.

MELO, L. F. et al. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: Gonadotropin-releasing hormone versus estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate versus estradiol benzoate at the end. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 9227–9237, nov. 2016.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, 15 jul. 2009.

MOREIRA, F. et al. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1237–1247, jun. 2000.

NASCIMENTO, A. B. et al. Produção e metabolismo da progesterona e seu papel antes, durante e depois da inseminação artificial influenciando a fertilidade de vacas leiteiras de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 01–14, 2013.

PEGORARO, L. M. C.; SAALFELD, M. H.; PRADIEÉ, J. **Inseminação artificial em bovinos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 412) 48 p.

PERES, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 15 set. 2009.

PFEIFER, L. F. M.; FERREIRA, R. **Ginecologia e ultrassonografia reprodutiva em bovinos**. 1^a ed. [s.l.] Embrapa, 2017.

PINAFFI, F. L. V.; ARAUJO, E. R.; GINTHER, O. J. Role of luteal biosynthesis of prostaglandin F2 α on function and structure of the corpus luteum during luteolysis in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 63, p. 10–14, 1 abr. 2018.

RAHE, C. H. et al. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 498–503, ago. 1980.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, abr. 2011.

SILVIA, W. J. et al. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 5, p. 655–663, nov. 1991.

SIQUEIRA, L. G. B. et al. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1–4, p. 18–28, out. 2009.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 Suppl 2, p. 57–65, jul. 2008.

SOUZA, A. H. et al. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 722–733, 1 mar. 2011.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 115–123, jan. 1991.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. et al. Mitos e verdades em protocolos de IATF. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 4, p. 129–141, 2016.

TREVISOL, E. et al. Luteólise em bovinos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 29–36, 2013.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reproductive programs for beef cattle: incorporating management and reproductive techniques for better fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, n. 3, p. 547–557, 2017.

VON EULER, U. S. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, v. 175, n. 78, 1934.

WALDMANN, A. et al. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination--effects on non-return and repeat-breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1–2, p. 33–41, 31 jan. 2001.

WOLFENSON, D. et al. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042–1055, 15 set. 2004.

Dose reduction of prostaglandin F_{2α} analogue (cloprostenol) in FTAI protocol in Nellore cyclic cows

Celina Alves de Oliveira^{a,*}, Vivian Angélico Pereira Alfradique^a, Domingos Lollobrigida de Souza Netto^a, Danielle Estanislau Coelho Silva^a, Denise Silva Okano^a, Edgar Andrés Díaz Miranda^a, Eunice Oba^b, Jurandy Mauro Penitente-Filho^a, José Domingos Guimarães^a

^a *Departament of Veterinary, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil*

^b *Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil*

* Corresponding authors:

E-mail addresses: celinadeoliveira.alves@gmail.com (C.A. DE OLIVEIRA); vivianangelico@gmail.com (V.A.P. ALFRADIQUE); domingoslollobrigida@yahoo.com.br (D.L. DE SOUZA NETTO); dani-est.medvet@hotmail.com (D.E.C. SILVA); deniseokano@gmail.com (D.S. OKANO); eddimi07@hotmail.com (E.A.D. MIRANDA); eunice.oba@unesp.br (E. OBA); penitentefilho@yahoo.com.br (J.M. PENITENTE FILHO); jdguima.ufv@gmail.com (J.D. GUIMARÃES)

ABSTRACT

This study investigated the efficiency of a reduced dose of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (cloprostenol) analogue in the complete luteolysis of cyclic Nellore cows. 68 multiparous cows were evaluated over 3 FTAI protocols and were randomly divided into 2 treatments: Day 0 (D0) = intravaginal device containing 1 g progesterone insertion + intramuscular (IM) application of 2 mg estradiol benzoate (EB; RIC-BE; Day 8 (D8) = intravaginal implant withdrawal + cloprostenol 0.250 mg or cloprostenol 0.500 mg; Day 9 (D9) = 1 mg estradiol benzoate; Day 10 (D10) = artificial insemination. Measurement of follicle diameter and ovulation detection were performed by daily ultrasonography from the moment immediately before progesterone (P4) device withdrawal until 72 hours after the P4 device removal (0, 24, 48 and 72h). Blood samples of 40 cows (29 ovulated and 11 non-ovulated) were obtained for P4 assay. The mean values of the preovulatory follicle diameter, the growth rate and the ovulation rate did not differ between the 0.500 mg and 0.250mg $PGF_{2\alpha}$ treatments. The follicular diameter at 0, 24, 48 and 72h was larger in ovulated than in non-ovulated cows. Considering ovulated and non-ovulated cows, P4 was similar between treatments at the evaluated times. The 0.250 mg treatment showed a slower decrease in P4 levels and was still able to promote complete functional luteolysis. These results show that the dose of 0.250 mg of cloprostenol is recommended in the FTAI protocol evaluated, promoting complete luteal regression and consequent ovulation.

Keywords: Bovine; Corpus luteum; Luteolysis; Progesterone; Zebu cattle

2. INTRODUCTION

Prostaglandins are hydroxylated fatty acids derived from arachidonic acid. Under normal conditions, they have a very low half-life and plasma concentration due to their high sensitivity to oxidation, which occurs in the lung (Cooper, 1981). In animal reproduction, the use of prostaglandins is widespread; seen in labor induction, treatment of reproductive disorders such as uterine infections and ovarian cysts, and reproductive technology (Brito; Palmer, 2004; Melendez et al., 2004; Ribeiro et al., 2012).

Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) has been established as one of the main reproductive biotechniques of beef cattle, due to its applicability and field results. Among the drugs most commonly used for female bovine estrous cycle control are progestogens, estrogens, and prostaglandins (Bó; Baruselli, 2014; Meneghetti et al., 2009).

The FTAI protocols are based on the following strategy: to synchronize the emergence of a new follicular wave, to control the duration of the progesterone phase, and to induce dominant follicle (DF) to ovulate.

In FTAI, prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) has an essential function because its luteolytic action promotes the reduction of plasma progesterone (P4), allowing the DF to become preovulatory and to ovulate. The low progesterone concentration near the time of artificial insemination is crucial for oocyte fertilization and conception. Thus, adequate luteal regression is necessary for the applied protocols (Pursley et al., 2012; Trevisol et al., 2013).

The main factors that interfere with the variation in the response to $PGF_{2\alpha}$ are the phase of the estrous cycle in which the female is at the time of administration and the dosage. Different bases of $PGF_{2\alpha}$ have been tested at different doses. The use of 12.5 mg dinoprost tromethamine (half of the conventional) dose has already been established in studies in dairy cattle (Ambrose et al., 2015) and beef cattle (Ferreira, 2017). In the case of cloprostenol sodium, comparing different doses, research shows controversial results, which vary according to the stage of life of the corpus luteum (CL) (Gioso et al., 2005) and the route of administering used (intramuscular, subcutaneous, intravulvosubmucosal) (Alvarez et al., 1991; Colazo et al., 2002). Although many studies have tested the efficacy of $PGF_{2\alpha}$ dose reduction in luteolysis, few studies applied this proposal in 9-11 day FTAI protocols, which are the most commonly used in Brazil.

Moreover, costs per calf produced at FTAI encompass all stages of production, including maintaining females on the property, infrastructure, veterinary technical assistance, and hormones. The cost of the protocol per animal varies according to the bases and products chosen, and represents considerable value in the final cost per pregnancy.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficiency of half of the recommended dose of $PGF_{2\alpha}$ analogue (cloprostenol sodium) to promote complete luteolysis in Nelore cows in FTAI protocol. Thus, this field strategy would allow lower spending and a greater margin of financial return to the producer.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Animals and Ethics

The experiment was carried out along breeding season from December / 2018 to March / 2019 in the Beef Cattle sector of the Universidade Federal de Viçosa - Campus Florestal, Florestal - MG. During the experimental period, the monthly average temperature was 23°C and the rainfall was 227.5 mm (CPTEC/INPE, 2019). A total of 68 pluriparous cyclic Nelore cows with body condition score (ECC) between 2.5 and 3.5 were selected according to the scale of 1 (very thin) to 5 (obese) established by Houghton et al. (1990). The animals, aging from 3

to 6 years, were evaluated by palpation and transrectal ultrasound examination, without gynecological abnormalities and were kept under grazing conditions, on *Urochloa decumbens* pasture, mineral salt and free water. The study was approved and conducted according to the Ethics Committee for the Use of Farm Animals - CEUAP / UFV, under protocol 013/2019.

3.2. Experimental design

Three FTAIs were performed in the experimental period with 65, 32 and 16 animals participating in FTAI1, FTAI2 and FTAI3, respectively. Animals were randomly divided into 2 treatments: Day 0 (D0) = intravaginal device containing 1 g progesterone insertion (P4; PRIMER; Tecnopec, Sao Paulo, SP, Brazil) + intramuscular (IM) administration of 2 mg estradiol benzoate (EB; RIC-BE; Tecnopec, Sao Paulo, SP, Brazil); Day 8 (D8) = intravaginal device withdrawal + 0.250 mg cloprostenol (0.250 mg treatment) (PGF_{2α}; Ciosin; MSD, São Paulo, SP, Brazil) or 0.500 mg cloprostenol (0.500 mg treatment) (PGF_{2α}; Ciosin; MSD, São Paulo, SP, Brazil); Day 9 (D9) = 1 mg EB; Day 10 (D10) = artificial insemination.

3.3. Measurement of follicle diameter and ovulation detection

Transrectal ultrasound examinations of the genital organs were performed using an ultrasound device (Mindray DP-2200VET®, Shenzhen, China), coupled to a linear transducer at a frequency of 7.5 MHz.

Follicular diameter measurements were performed by daily ultrasound examinations of the right and left ovaries from the moment immediately before P4 device withdrawal until 72 hours after. The largest follicle identified was determined by the average of two perpendicular measurements of the diameter.

The follicle that presented larger diameter measurement at the moment of the P4 device withdrawal (0h) was considered the largest follicle (F1). This follicle was measured daily during four days (0, 24, 48 and 72h).

Ovulation was defined as the time of disappearance of the largest follicle previously measured and was confirmed on the eighth day after AI by the corpus luteum ultrasound visualization.

3.4. Blood sampling and progesterone assay

Blood samples were collected from 20 cows in each treatment (29 ovulated and 11 non-ovulated) by puncture of the coccygeal artery or vein at the 0h, 24h, 48h and 72h after

the P4 device withdrawal. The collection was performed in a blood tube with clot activator, cooled on ice and the serum was obtained by centrifugation ($2500 \times g$ for 10 minutes) and stored in a 2 mL microtube at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent P4 dosage. Plasma P4 concentration was determined by radioimmunoassay (RIA) technique using a solid-phase progesterone kit (Beckman Coulter; California, USA) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of P4 assay was 0.03 ng/mL, and the intra- and inter-assay CV were 8.5% and 8.66%, respectively.

3.5. Statistical analyses

For data analyses, the Statistical Analysis System (SAS, version 9.4) was used. Quantitative variables were subjected to the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests to verify the normality of errors and homogeneity of variances, respectively.

The experiment was conducted in a completely randomized design. The evaluation of the pre-ovulatory follicle diameter and the follicular growth rate was performed by the GLM procedure and followed the model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (1)$$

Where: Y_{ij} , response; μ , constant; T_i , effect of treatment; and e_{ij} , error.

The evaluation of the diameter of the largest follicle (F1) from day 8 until ovulation was performed in repeated measures over time by the MIXED procedure and followed the model:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + D_j + O_k + (TD)_{ij} + (TO)_{ik} + (DO)_{jk} + (TDO)_{ijk} + e_{ijkl} \quad (2)$$

Where: Y_{ijkl} , response; μ , constant; T_i , effect of treatment; D_j , effect of time (day); O_k , effect of ovulation (ovulated and non-ovulated cows); $(TD)_{ij}$, treatment and time interaction; $(TO)_{ik}$, treatment and ovulation interaction; $(DO)_{jk}$, time and ovulation interaction; $(TDO)_{ijk}$, triple interaction; and e_{ijkl} , error.

The repeated measures factor was the day in each level of animal (subject), a covariance matrix of autoregressive structure ($AR(1)$) was used. The data were then subjected to analysis of variance and the LS-means compared by the t test (LITTELL et al., 2006).

The data regarding serum progesterone levels were submitted to logarithmic transformation ($Y' = \ln Y$) and evaluated in repeated measures over time by the MIXED procedure, following the mathematical model in 2. The repeated measures factor was the day

in each animal level (*subject*), a covariance matrix of heterogeneous autoregressive structure (*ARH(1)*) was used. The data were then subjected to analysis of variance and the LS-means compared by *t* test (Littell et al., 2006).

The drop in progesterone levels in relation to time 0 (day 8) was calculated by the difference between the values (in logarithm) of progesterone in times 24, 48 and 72 hours and time 0. The values were then analyzed by GLM procedure according to the model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (TD)_{ij} + e_{ijkl} \quad (3)$$

Where: Y_{ijk} , response; μ , constant; T_i , effect of treatment; D_j , effect of time (day); $(TD)_{ij}$, treatment and time interaction; and e_{ijk} , error.

Ovulation rates were organized in contingency tables and analyzed using Fisher's exact test (FREQ procedure). The effect of the diameter of the largest follicle (F1) on day 8 on the probability of ovulation was assessed by univariate logistic regression (LOGISTIC procedure). The results are presented as mean and standard error of the mean (SEM). The level of significance adopted was $\alpha = 0.05$.

4. RESULTS

4.1. Follicular evaluation

Regardless the FTAI, the mean diameter of the preovulatory follicle and the growth rate were 13.22 mm; 1.19 mm/day in the 0.500 mg treatment and 14.29 mm and 1.28 mm/day in the 0.250 mg treatment, respectively.

The diameter of the preovulatory follicle (Fig. 1), growth rate (Fig. 2) and ovulation rate (Table 1) did not differ between treatments overall and either in each FTAI ($P > 0.05$).

In ovulated and non-ovulated cows during FTAI 1, 2 and 3, F1 diameter was affected by the time ($P < 0.05$; Table 2). Treatment effect was not significant ($P > 0.05$) in the F1 diameter. Time $\times$ ovulation interaction was significant ($P < 0.05$) in the follicular measurement in FTAI 1 and FTAI 3. In all FTAI, regardless treatment, the F1 diameter was larger in ovulated than in non-ovulated cows at 0, 24 48 and 72h (Table 3).

The follicular diameter measured at the moment of P4 device withdrawal affected the probability of ovulation (Fig. 3). As the follicular diameter at 0h increased, the probability of ovulation also increased and reached a plateau after approximately 12 mm in diameter.

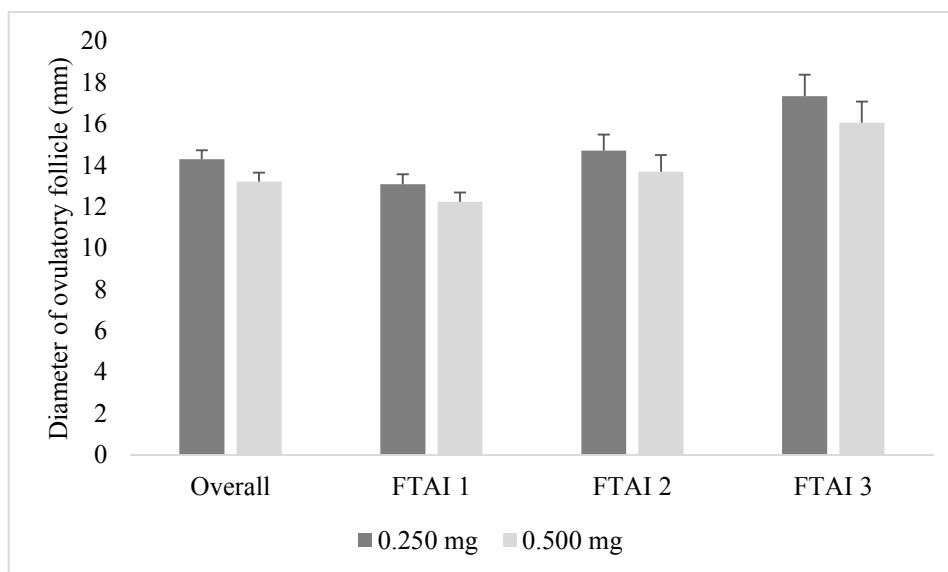


Fig. 1. Diameter of preovulatory follicle (mm) of cyclic Nelore cows submitted to 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol in overall and each FTAI. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $P > 0.05$.

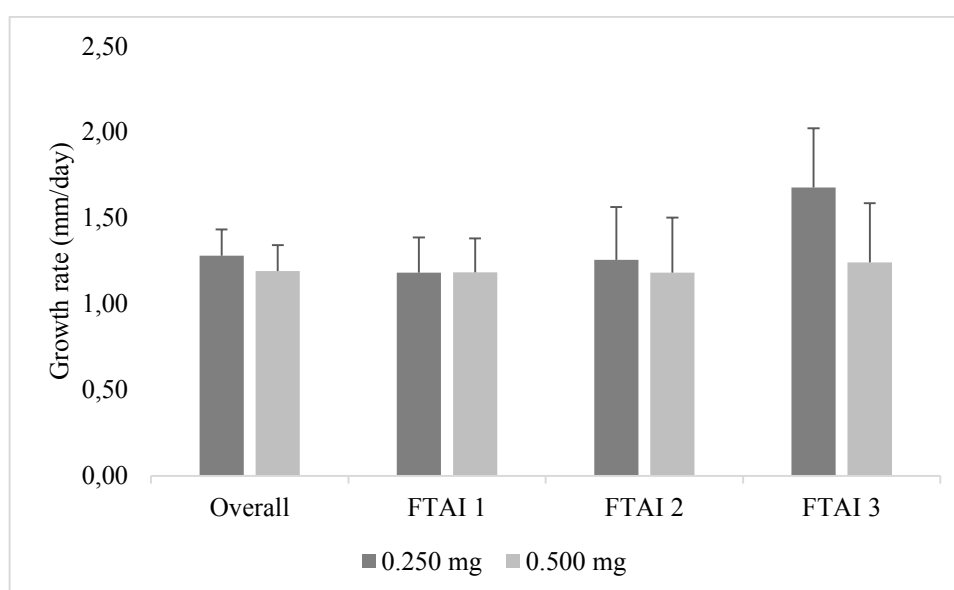


Fig. 2. F1 growth rate (mm/day) of cyclic Nelore cows submitted to 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol in overall and each FTAI. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $P > 0.05$.

Table 1. Ovulation rate of cyclic Nelore cows treated with 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol in overall and each FTAI

Treatments	Overall	FTAI 1	FTAI 2	FTAI 3
0.250 mg	67,80	61,76	76,47	75,00
0.500 mg	75,93	74,19	80,00	75,00
P value	0,4053	0,3043	1,0000	1,0000

$P > 0.05$

Table 2. Diameter of F1 (mm) at 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal in each FTAI of cyclic Nellore cows submitted to 0.500 mg or 0.250 mg of cloprostenol (Mean $\pm$ SEM)

Treatments	0h	24h	48h	72h
FTAI 1				
<i>Ovulated</i>				
0.500 mg	9.80 $\pm$ 0.44 ^{bA}	12.56 $\pm$ 0.45 ^{aA}	12.41 $\pm$ 0.45 ^{aA}	11.60 $\pm$ 0.61 ^{aA}
0.250 mg	10.91 $\pm$ 0.46 ^{bA}	12.44 $\pm$ 0.46 ^{aA}	13.11 $\pm$ 0.48 ^{aA}	13.37 $\pm$ 0.81 ^{aA}
<i>Non-ovulated</i>				
0.500 mg	6.57 $\pm$ 0.75 ^{bA}	7.04 $\pm$ 0.76 ^{bA}	7.93 $\pm$ 0.75 ^{abA}	8.94 $\pm$ 0.77 ^{aA}
0.250 mg	8.19 $\pm$ 0.60 ^{aA}	8.51 $\pm$ 0.59 ^{aA}	8.37 $\pm$ 0.59 ^{aA}	7.44 $\pm$ 0.65 ^{aA}
FTAI 2				
<i>Ovulated</i>				
0.500 mg	11.22 $\pm$ 0.78 ^{cA}	13.04 $\pm$ 0.78 ^{bA}	14.01 $\pm$ 0.78 ^{aA}	11.78 $\pm$ 1.27 ^{bcA}
0.250 mg	11.99 $\pm$ 0.75 ^{bA}	13.08 $\pm$ 0.75 ^{aA}	14.58 $\pm$ 0.75 ^{aA}	14.60 $\pm$ 1.09 ^{aA}
<i>Non-ovulated</i>				
0.500 mg	8.19 $\pm$ 1.56 ^{aA}	8.92 $\pm$ 1.56 ^{aA}	8.22 $\pm$ 1.56 ^{aA}	7.76 $\pm$ 1.68 ^{aA}
0.250 mg	7.48 $\pm$ 1.35 ^{aA}	8.39 $\pm$ 1.35 ^{aA}	8.63 $\pm$ 1.35 ^{aA}	8.59 $\pm$ 1.42 ^{aA}
FTAI 3				
<i>Ovulated</i>				
0.500 mg	13.41 $\pm$ 1.21 ^{bA}	14.85 $\pm$ 1.21 ^{abA}	15.90 $\pm$ 1.21 ^{aA}	-
0.250 mg	14.00 $\pm$ 1.21 ^{bA}	15.84 $\pm$ 1.21 ^{aA}	17.35 $\pm$ 1.21 ^{aA}	-
<i>Non-ovulated</i>				
0.500 mg	8.20 $\pm$ 2.10 ^{aA}	6.88 $\pm$ 2.10 ^{aA}	6.71 $\pm$ 2.10 ^{aA}	-
0.250 mg	10.39 $\pm$ 2.10 ^{aA}	9.84 $\pm$ 2.10 ^{aA}	10.25 $\pm$ 2.10 ^{aA}	-

Within a row, different lowercase letters indicate difference ($P < 0.05$) among days by *t* test. Within a column, different uppercase letters indicate difference ($P < 0.05$) between treatments by *t* test.

Table 3. Diameter of F1 (mm) at 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal in each FTAI of ovulated and non-ovulated cyclic Nellore cows (Mean $\pm$ SEM)

Treatments	0h	24h	48h	72h
FTAI 1				
Ovulated	10.35 $\pm$ 0.32 ^{bA}	12.50 $\pm$ 0.32 ^{aA}	12.76 $\pm$ 0.33 ^{aA}	12.48 $\pm$ 0.51 ^{aA}
Non-ovulated	7.38 $\pm$ 0.48 ^{aB}	7.78 $\pm$ 0.48 ^{aB}	8.15 $\pm$ 0.48 ^{aB}	8.19 $\pm$ 0.50 ^{aB}
FTAI 2				
Ovulated	11.60 $\pm$ 0.54 ^{bA}	13.06 $\pm$ 0.54 ^{bA}	14.30 $\pm$ 0.54 ^{aA}	13.19 $\pm$ 0.84 ^{abA}
Non-ovulated	7.83 $\pm$ 1.03 ^{aB}	8.65 $\pm$ 1.03 ^{aB}	8.42 $\pm$ 1.03 ^{aB}	8.17 $\pm$ 1.10 ^{aB}
FTAI 3				
Ovulated	13.70 $\pm$ 0.86 ^{cA}	15.35 $\pm$ 0.86 ^{bA}	16.63 $\pm$ 0.86 ^{aA}	-
Non-ovulated	9.29 $\pm$ 1.49 ^{aB}	8.36 $\pm$ 1.49 ^{aB}	8.48 $\pm$ 1.49 ^{aB}	-

Within a row, different lowercase letters indicate difference ($P < 0.05$) among days by t test. Within a column, different uppercase letters indicate difference ($P < 0.05$) between ovulated and non-ovulated by t test.

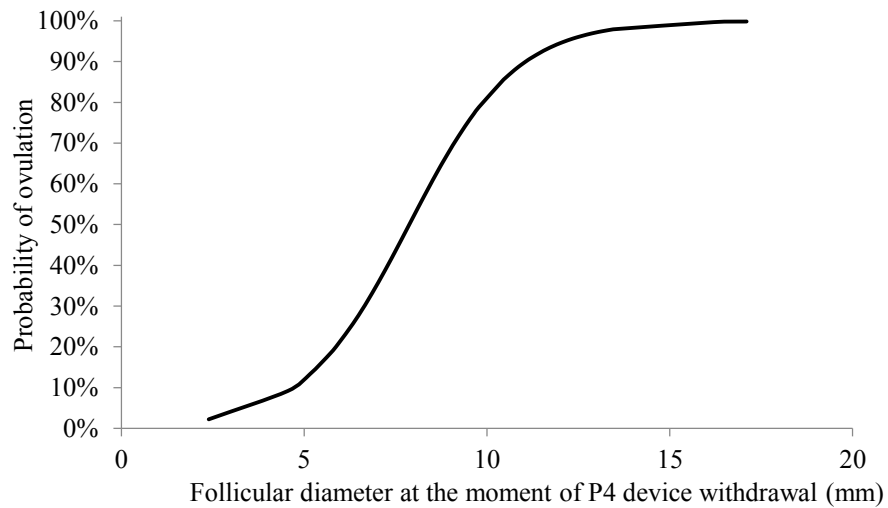


Fig. 3. Relationship between follicular diameter at the moment of withdrawal device progesterone (0h) and the probability of ovulation of cyclic Nellore cows at FTAI. $c = 0.855$.

$$\text{Probability of ovulation} = \frac{e^{(-5.4339 + 0.6901 \times FD)}}{1 + e^{(-5.4339 + 0.6901 \times FD)}}; P < 0.05.$$

4.2. Plasma progesterone concentration during 0, 24, 48 and 72h after P4 device withdrawal

Considering all cows (ovulated and non-ovulated), plasma progesterone concentration at 0, 24, 48 and 72h did not differ between treatments, ($P > 0.05$), except for time 24h ($P < 0.05$) and was affected by time ($P < 0.05$; Fig. 4). At 24h, the 0.250 mg group (4.82 ng/mL) presented higher progesterone level than the 0.500 mg group (2.74 ng/mL).

In ovulated cows, plasma progesterone concentration in the evaluated moments did not differ between treatments ($P > 0.05$) and was affected by the time ($P < 0.05$; Fig. 5). The average of preovulatory P4 concentration of all ovulated cows was 1.61 ng/mL, and, four cows showed a preovulatory P4 concentration higher than 2.0 ng/mL, seven between 1.51 and 2.0 ng/mL, twelve between 1.0 and 1.5 ng/mL and five lower than 1.0 ng/mL. In this evaluation moment, the value of one cow was excluded because was consider an outlier value within the expected plasma progesterone concentration.

In non- ovulated cows, plasma progesterone concentration in the evaluated moments did not differ between treatments ($P > 0.05$), except for time 24h ($P < 0.05$) and was affected by the time ($P < 0.05$; Fig. 7). At 24h, 0.250 mg group (3.35 ng/mL) was higher than 0.500 mg group (1.66 ng/mL). Ovulated cows presented higher ($P < 0.05$) progesterone levels compared with non-ovulated cows at 48 h (Fig. 8).

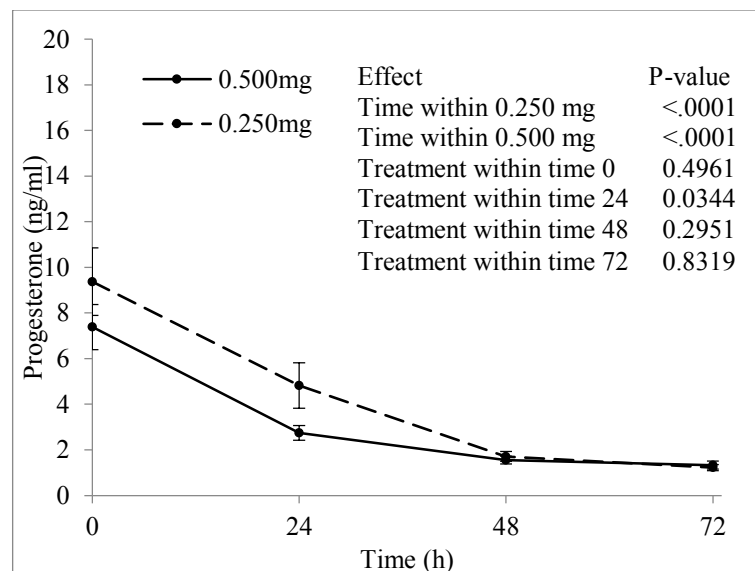


Fig. 4. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of cyclic Nellore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

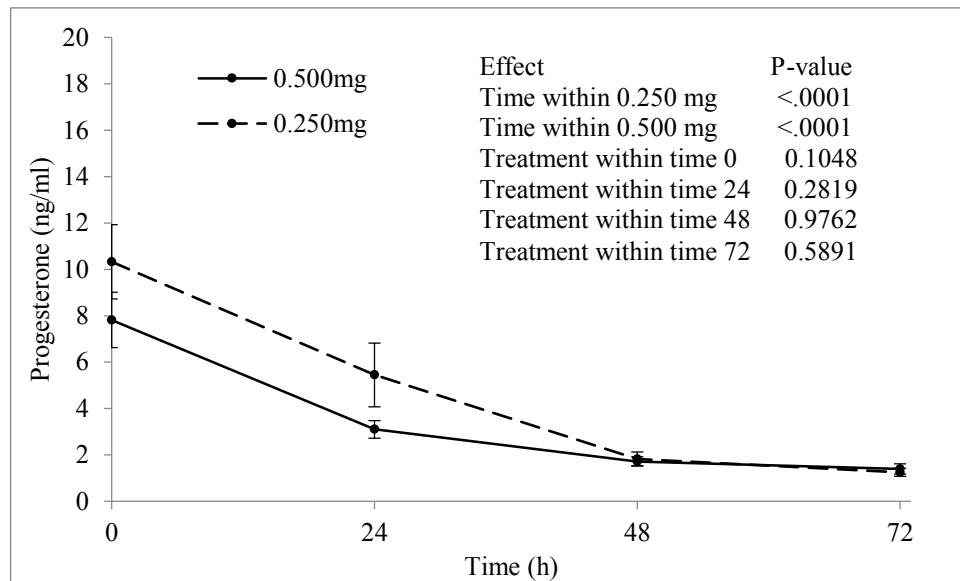


Fig. 5. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of ovulated cyclic Nellore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

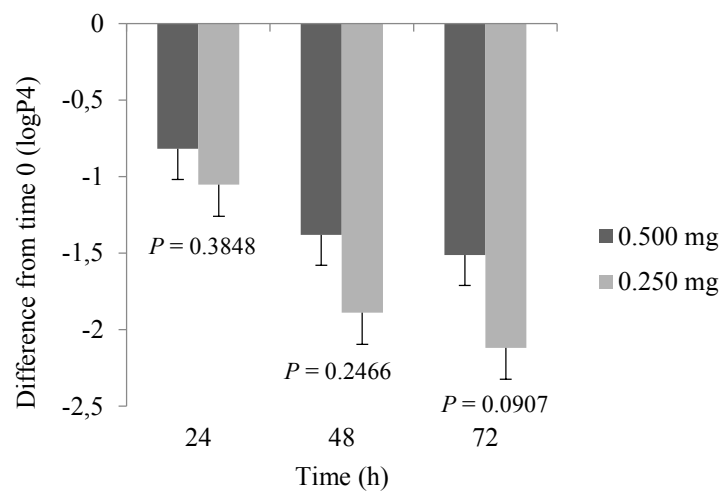


Fig. 6. Difference between log values of the progesterone levels from time 0h (Day 8 of FTAI protocol). P, p-values ($Pr > F$) between treatments within a time. Bars, SE.

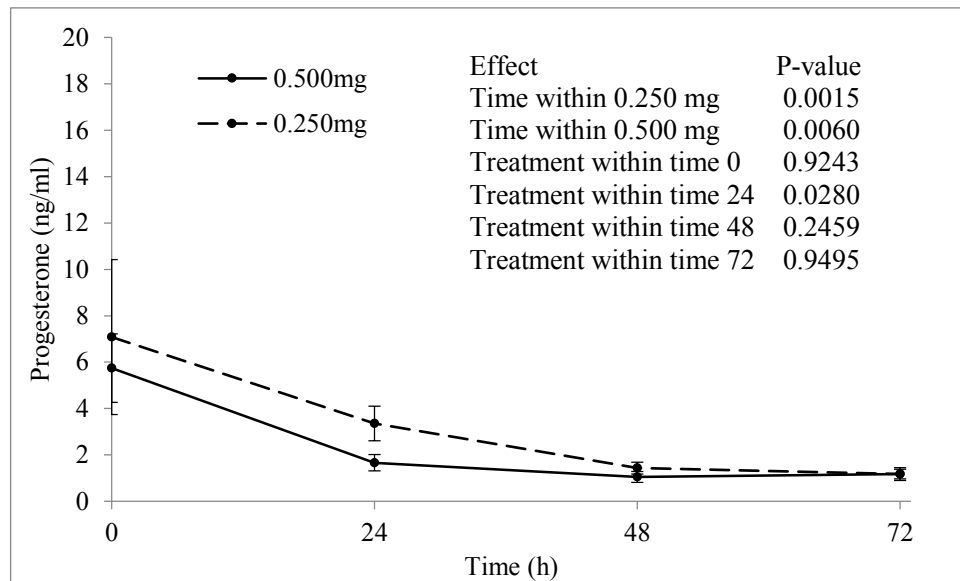


Fig. 7. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of non-ovulated cyclic Nellore cows submitted to 0.500 and 0.250 mg of cloprostenol in FTAI protocol. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

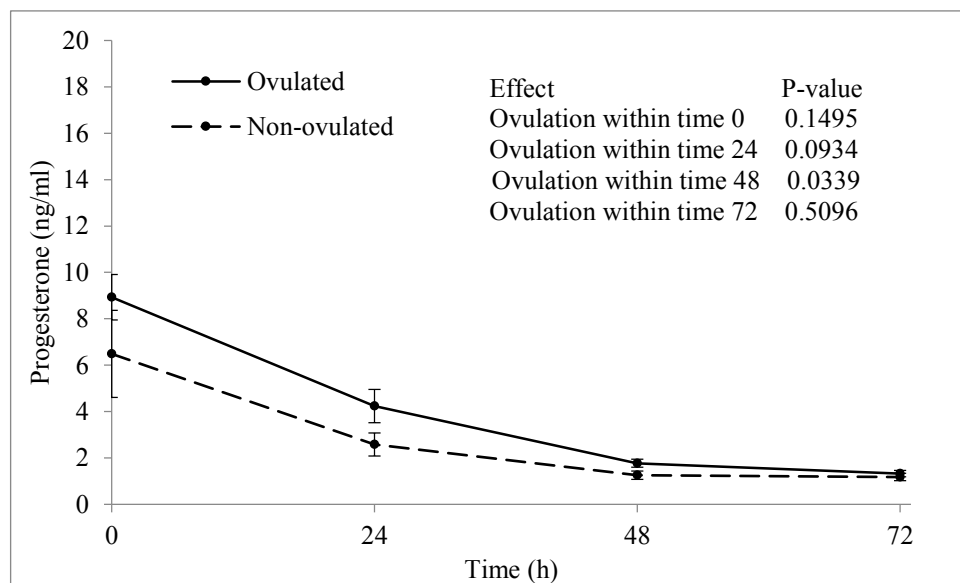


Fig. 8. Progesterone levels at 0, 24, 48 and 72h after P4 device removal of ovulated and non-ovulated cyclic Nellore cows regardless treatment (0.500 or 0.250 mg of cloprostenol) in FTAI protocol. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

5. DISCUSSION

In the present study, the reduction of the conventional dose of $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue did not affect the diameter of the preovulatory follicle, growth rate, and ovulation rate, maintaining low P4 levels (complete luteal functional regression) sufficient to allow the secretion of

preovulatory LH. Low P4 concentration associated with high E2 concentration will induce a preovulatory peak of LH, which is essential for ovulation, and possible success of the FTAI protocol (Roberson et al., 1989).

Our results showed that as the follicular diameter increased, the probability of ovulation also increased. Larger follicular diameter after deviation is related to higher levels of circulating 17β -estradiol, with increased expression of LH receptors, resulting in higher ovulation rates (Sá Filho et al., 2010; Simões et al., 2012). As well, a larger diameter of the ovulatory follicle is associated with the size of the subsequent corpus luteum. Larger corpus luteum results in higher levels of progesterone, increasing subsequent pregnancy rates (Vasconcelos et al., 2001). The F1 diameter of ovulated and non-ovulated cows showed a different pattern in follicular growth after P4 device removal. A high number of dominant follicles went into atresia in the non-ovulated cows. We hypothesized that an insufficient follicular growth of the new wave during P4 treatment (D0 to D8) could be the cause of the failure in the ovulation in these animals. Thus, the estrogen levels generated may have been insufficient and therefore, prevented the induction of the LH peak. The progesterone assay showed that even in the non-ovulated cows, both treatments were able to promote functional luteal regression between 48 and 72h, indicating that the P4 levels were not the cause of the non-occurrence of ovulation in these animals.

Considering ovulated and non-ovulated cows in both treatments, the P4 concentrations reduced expressively for up to 48h and did not differ between 48 and 72h. This pattern is in agreement with the results found in follicular measurements, where most animals ovulated between 48 and 72h, compatible with the interval from P4 device removal to ovulation of FTAI protocols that use estradiol benzoate at D9 as an ovulation inducer (Crepaldi, 2009; Ayres et al., 2007). The preovulatory P4 concentration mean was near, but not lower than 1 ng/mL, value established by other authors as the standard for the occurrence of complete luteolysis (Siqueira et al., 2009; Ribeiro et al., 2012; Mann; Lamming, 2006). Our hypothesis is that the 24-hour interval between blood sampling may have led to less precision in the values that P4 reached before the ovulation.

The 0.250 mg treatment promoted a slower reduction in plasma P4 concentration compared with 0.500 mg treatment. However, both treatments were able to promote a functional luteolysis, without compromising ovulation or follicular growth, since the average values of follicular diameter and the ovulation rate did not differ between the treatments. The luteolytic action of PGF in lower doses has been widely studied over the years to determine the minimal effective dose for exogenous $\text{PGF}_{2\alpha}$ capable of leading to adequate levels of progesterone

during luteal regression. Meira et al. (2006) reported positive result using a reduced dose of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (luprostiol; 50% of the conventional dose) via IM and intravulvasubmucous for inducing complete luteolysis and anticipating estrus in non-lactating Nellore cows. However, 25% of the conventional dose (IM) was not sufficient to promote complete luteal regression since P4 concentrations increased after 48h post-treatment. Gioso et al. (2005) showed satisfactory results in luteolysis and estrus synchronization using 50% of the conventional dose of cloprostenol (IM and IVSM), reaching concentrations of P4 below 1.0 ng / mL 48h after $\text{PGF}_{2\alpha}$ administration. Garcia-Winder and Gallegos-Sánchez (1991) tested the use of reduced doses of dinoprost (IM) in estrus synchronization and obtained satisfactory results in the induction of complete luteolysis with 70% of the dose, while females treated with 40% of the dose presented partial luteolysis. Therefore, the use of doses with at least 50% of the conventional dose of different $\text{PGF}_{2\alpha}$ bases has been shown to be efficient.

The luteolytic response of prostaglandin is dependent on the diestrus phase (early, middle and late phase) at the moment of prostaglandin administration: an early CL shows less responsiveness to $\text{PGF}_{2\alpha}$ than a mid-luteal stage (Berardinelli; Adair, 1989). However, in this study, the insertion of P4 device and administration of EB at D0 should suppress circulating FSH and LH concentrations, promoting the regression of the current follicular wave and preventing ovulation (negative feedback of P4 on LH). Therefore, an early CL would be not present at the moment of the $\text{PGF}_{2\alpha}$ administration (0h).

The finding that ovulated cows had higher P4 levels than non-ovulated cows was an unexpected result in this study. Our hypothesis is that ovulatory follicles, due to their larger diameter, have a greater capacity for progesterone production by granulosa cells. This hypothesis is supported by the results of Skinner and Osteen (1988) that showed an increase in progesterone production by *in vitro* cultured granulosa cells with the increase in follicle size. Similar results were found by Dieleman et al., (1982) and Fortune et al. (2009), in which progesterone concentrations increased in the follicular fluid of cows a few hours after the LH peak and then just before ovulation. Also, there was an increase in the width of granulosa cells and the theca interna cells membranes after the LH peak and before ovulation (Dieleman et al., 1982).

6. CONCLUSIONS

The use of 0.250 mg cloprostenol (half of the conventional dose) was sufficient to cause complete functional luteolysis in cyclic Nelore cows in the evaluated FTAI protocol. Despite plasma progesterone concentrations reduced more slowly in the 0.250 mg treatment, this treatment did not affect the ovulation rate, follicular growth rate, and diameter of preovulatory follicle. The reduction of this prostaglandin F_{2α} analogue is recommended under the conditions evaluated, leading to a reduction in the protocol costs and increasing the profit of the producer.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CNPq, CAPES and Fapemig.

REFERENCES

- Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol. Reprod.* 66, 651–658. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.651>
- Alvarez, R.H., Meirelles, C.F., Ambrosano, G.M.B., Oliveira, J.V., Pozzi, J.R., 1991. The use of lower doses of the prostaglandin analogue, cloprostenol, for oestrus synchronization in heifers. *Animal Reproduction Science* 25, 93–96. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90033-V](https://doi.org/10.1016/0378-4320(91)90033-V)
- Ambrose, D.J., Gobikrushanth, M., Zuidhof, S., Kastelic, J.P., 2015. Low-dose natural prostaglandin F_{2α} (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. *Theriogenology* 83, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.034>
- Ayres, H., Martins, C.M., Ferreira, R.M., Mello, J.E., Dominguez, J.H., Souza, A.H., Valentin, R., Santos, I.C.C., Baruselli, P.S., 2008. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*)

- treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.001>
- Berardinelli, J.G., Adair, R., 1989. Effect of prostaglandin F2alpha dosage and stage of estrous cycle on the estrous response and corpus luteum function in beef heifers. *Theriogenology* 32, 301–314. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(89\)90320-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(89)90320-8)
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2014. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal* 8 Suppl 1, 144–150. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000822>
- Brito, L.F.C., Palmer, C.W., 2004. Cystic Ovarian Disease in Cattle. *Larger Animal Veterinary Rounds* 4, 1–6.
- Colazo, M.G., Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., 2002. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 47–62. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00087-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00087-8)
- Cooper, M., 1981. Prostaglandins in veterinary practice. In *Pract* 3, 30, 32–34. <https://doi.org/10.1136/inpract.3.1.30>
- CPTEC/INPE, 2019. <http://tempo.cptec.inpe.br/> (accessed 10 October 2019).
- Crepaldi, G.A., 2009. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF. Dissertation (MSc in Animal Reproduction), Universidade de São Paulo, p.87. <https://doi.org/10.11606/D.10.2009.tde-17122009-133943>
- Dieleman, S.J., Kruip, T.A., Fontijne, P., de Jong, W.H., van der Weyden, G.C., 1983. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 97, 31–42. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0970031>
- Ferraz Junior, M.V.C., Pires, A.V., Biehl, M.V., Santos, M.H., Polizel, D.M., Nepomuceno, D.D., Sartori, R., Barreto Filho, J.B., Gonçalves, J.R.S., Day, M.L., 2016. Luteolysis in *Bos indicus* cows on Days 5 and 7 of estrous cycle with varying doses of PGF2α. *Theriogenology* 86, 1268–1274. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.067>

- Ferreira, L.F.V., 2017. Taxa de gestação de fêmeas Nelore confinadas, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo. Dissertation (MSc in Animal Science), Universidade Federal de Minas Gerais, p. 41.
- Fortune, J.E., Willis, E.L., Bridges, P.J., Yang, C.S., 2009. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod* 6, 60–71.
- Garcia-Winder, M.J., Gallegos-Sánchez, J., 1991. Estrus synchronization in Holstein cows using reduced doses of prostaglandin F(2)alpha. *Theriogenology* 36, 191–199. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90378-q](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90378-q)
- Gioso, M.M., Costa, E.P. da, Fernandes, C.A. de C., Torres, C.A.A., Carvalho, G.R. de, 2005. Perfil de progesterona e intervalo ao estro de receptoras bovinas sincronizadas com doses reduzidas de cloprostenol. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 1181–1187. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000400012>
- Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Moss, G.E., Hendrix, K.S., 1990. Prediction of Postpartum Beef Cow Body Composition Using Weight to Height Ratio and Visual Body Condition Score. *J Anim Sci* 68, 1428–1437. <https://doi.org/10.2527/1990.6851428x>
- Levy, N., Kobayashi, S., Roth, Z., Wolfenson, D., Miyamoto, A., Meidan, R., 2000. Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol. Reprod.* 63, 377–382. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.377>
- Littell, R.C.; Milliken, G.A.; Stroup, W.W.; Wolfinger, R.D.; Schabenberger, O., 2006. SAS® for mixed models, 2nd ed. Cary, North Carolina, p. 814.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2006. Timing of prostaglandin F(2alpha) release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.08.005>
- Meira, C., Pessoa, V.M., Ferreira, J.C.P., Araujo, G.H.M., Gioso, M.M., Bicudo, S.D., Oba, E., Orlandi, C., 2006. Alternative low doses and routes of administering a prostaglandin

- F2 α analogue to induce luteolysis in Nelore cows. *J Vet Sci* 7, 387–390. <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.4.387>
- Melendez, P., McHale, J., Bartolome, J., Archbald, L.F., Donovan, G.A., 2004. Uterine involution and fertility of holstein cows subsequent to early postpartum PGF2 α treatment for acute puerperal metritis. *J. Dairy Sci.* 87, 3238–3246. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73460-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73460-8)
- Meneghetti, M., Sá Filho, O.G., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology* 72, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.010>
- Nascimento, A.B., Souza, A.H., Keskin, A., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2014. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF2 α in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 81, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.009>
- Peres, R.F.G., Claro, I., Sá Filho, O.G., Nogueira, G.P., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 72, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.026>
- Pursley, J.R., Martins, J.P.N., Wright, C., Stewart, N.D., 2012. Compared to dinoprost tromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. *Theriogenology* 78, 823–829. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.032>
- Ribeiro, E.S., Bisinotto, R.S., Favoreto, M.G., Martins, L.T., Cerri, R.L.A., Silvestre, F.T., Greco, L.F., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.012>
- Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Stumpf, T.T., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.* 41, 997–1003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.6.997>

- Sá Filho, M.F., Crespilho, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A., Baruselli, P.S., 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.* 120, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.007>
- Simões, R.A.L., Satrapa, R.A., Rosa, F.S., Piagentini, M., Castilho, A.C.S., Ereno, R.L., Trinca, L.A., Nogueira, M.F.G., Buratini, J., Barros, C.M., 2012. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology* 77, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.027>
- Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Amorim, L.S., Souza, E.D., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2009. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.009>
- Skinner, M.K., Osteen, K.G., 1988. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology* 123, 1668–1675. <https://doi.org/10.1210/endo-123-3-1668>
- Trevisol, E., Ferreira, J.C.P., Ackermann, C.L., Destro, F.C., Amaral, J.B., 2013. Luteólise em bovinos: revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 37, 29–36.
- Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., Wiltbank, M.C., 2001. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56, 307–314. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00565-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00565-9)
- Valdecabres-Torres, X., García-Roselló, E., García-Muñoz, A., Cuervo-Arango, J., 2012. Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. *J. Dairy Sci.* 95, 4389–4395. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5284>