

EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO UTILIZANDO DISPOSITIVO DE PROGESTERONA ASSOCIADO COM GnRH OU BENZOATO DE ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE¹

VINICIUS ANTÔNIO PELISSARI PONCIO², ALFREDO JOSÉ FERREIRA MELO², KEILA MARIA RONCATO DUARTE³, CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA⁴, RAFAEL HERRERA ALVAREZ^{2*}

¹Recebido para publicação em 03/07/15. Aceito para publicação em 22/09/15.

²Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Sul, Piracicaba, SP, Brasil.

³Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor correspondente: rherrera@apta.sp.gov.br

RESUMO: O emprego de estrógenos nos protocolos hormonais para programar a inseminação artificial dos bovinos é o método mais barato e eficiente atualmente disponível. Entretanto, a tendência de proibir o uso de estrógenos para esse propósito torna necessária a procura por alternativas que substituam os estrógenos sem prejudicar o desempenho reprodutivo dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar as taxas de concepção de novilhas de corte *Bos indicus* tratadas com dispositivo de progesterona (P4) associado ao GnRH ou a um éster de estradiol. Novilhas púberes da raça Nelore (n = 100) foram tratadas no dia 0 com um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 e distribuídas aleatoriamente em dois grupos. O grupo GnRH (n = 49) recebeu uma injeção im de 100 µg de GnRH, enquanto que o grupo E2 (n = 51) recebeu 2 mg de benzoato de estradiol (BE). O dispositivo de P4 foi removido após 5 (grupo GnRH) ou 8 (grupo E2) dias, seguido de uma injeção de 125 µg do análogo de PGF_{2α}, cloprostenol. Nesse momento, o grupo E2 recebeu, adicionalmente, 300 UI de eCG. Vinte e quatro horas depois, o grupo GnRH recebeu uma segunda injeção de 125 µg de cloprostenol, enquanto que o grupo E2 recebeu 1 mg de BE. As novilhas foram inseminadas 72 (grupo GnRH) ou 54 (grupo E2) horas após a retirada do dispositivo de P4 e, no momento da inseminação, o grupo GnRH recebeu adicionalmente uma injeção de 100 µg de GnRH. O cio foi monitorado no período da injeção de cloprostenol até o momento da inseminação artificial (IA) e o diagnóstico de prenhez foi realizado 40 dias após a IA, utilizando ultrassonografia transretal. Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher. A taxa de prenhez foi 38,8% e 31,4% para os grupos GnRH e E2, respectivamente (P>0,05). Houve uma tendência (P=0,07) da condição ovariana das novilhas, ciclando ou em anestro, influenciar a taxa de prenhez no grupo GnRH, mas não no grupo E2. No momento da IA, 33,3% das novilhas do grupo GnRH apresentaram sinais de cio contra 88,2% do grupo E2 (P<0,05). Contudo, o momento de manifestação do cio não influenciou a taxa de prenhez. Em conclusão, o uso de GnRH pode ser recomendado para substituir o estradiol nos protocolos de sincronização do cio visando a IATF em novilhas Nelore.

Palavras-chave: *Bos indicus*, BE, Co-synch 5 dias, IATF, taxa de prenhez.

EFFICIENCY OF FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION USING A PROGESTERONE DEVICE COMBINED WITH GnRH OR ESTRADIOL BENZOATE IN NELLORE HEIFERS

ABSTRACT: The use of estrogens in artificial insemination protocols for cattle is the least expensive and most efficient method currently available. However, the trend to prohibit the use of estrogens for this purpose has made it necessary to find alternatives that replace estrogens

without compromising the reproductive performance of the animals. The objective of this study was to evaluate conception rates in *Bos indicus* beef heifers treated with a progesterone device (P4) combined with GnRH or an estradiol ester. On day 0, pubertal Nellore heifers (n = 100) received an intravaginal device containing 1 g P4 and were randomly divided into two groups. The GnRH group (n = 49) received an intramuscular injection of 100 µg GnRH, while the E2 group (n = 51) received 2 mg estradiol benzoate (EB). The P4 device was removed after 5 (GnRH group) or 8 days (E2 group), followed by an injection of 125 µg of the PGF_{2α} analog cloprostenol. On that occasion, the E2 group received an additional injection of 300 IU eCG. Twenty-four hours later, the GnRH group received a second injection of 125 µg cloprostenol, while the E2 group received 1 mg EB. The heifers were inseminated 72 (GnRH group) or 54 hours (E2 group) after removal of the P4 device. At the time of insemination, the GnRH group received additionally an injection of 100 µg GnRH. Estrus was monitored during the period of cloprostenol injection until the time of artificial insemination and pregnancy was diagnosed 40 days after insemination by transrectal ultrasonography. The data were analyzed by Fisher's exact test. The pregnancy rate was 38.8% and 31.4% in the GnRH and E2 groups, respectively (P>0.05). The ovarian condition of the heifers (estrus or anestrus) tended to influence (P=0.07) pregnancy rates in the GnRH group, but not in the E2 group. At the time of artificial insemination, 33.3% of heifers in the GnRH group showed signs of estrus versus 88.2% in the E2 group (P<0.05). However, the time of estrus manifestation did not influence pregnancy rates. In conclusion, GnRH can be recommended to replace estradiol in estrus synchronization protocols for fixed-time artificial insemination in Nellore heifers.

Keywords: *Bos indicus*, estradiol benzoate, 5 day Co-synch, FTAI, pregnancy rate.

INTRODUÇÃO

A introdução de material genético superior através da inseminação artificial (IA) é comprovadamente a maneira mais eficaz de fazer melhoramento genético nos rebanhos (ALVAREZ, 2008). Por sua vez, a prática da IA é grandemente facilitada pelo emprego de protocolos de sincronização da ovulação, os quais possibilitam que um grupo de animais possa ser inseminado, sem comprometer a fertilidade, em um período de tempo pré-determinado (IATF), independentemente da manifestação do cio (ALVAREZ, 2000).

A maioria dos protocolos de sincronização da ovulação baseiam-se no emprego de hormônios específicos, capazes de controlar o desenvolvimento da onda folicular, de estimular o crescimento de um folículo até o estágio preovulatório e induzir tanto a regressão do corpo lúteo como a ovulação no final do tratamento (WILT BANK e PURSLEY, 2014). Os principais produtos disponíveis utilizados para esses propósitos incluem os estrógenos, o GnRH (ou LH e hCG), a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e os progestágenos. A função básica do GnRH no início do tratamento é induzir a ovulação ou luteinização de eventuais folículos dominantes ovarianos, resultando no crescimento de um novo folículo, portador do oócito que será liberado após uma segunda aplicação de GnRH, pouco antes ou durante a IATF. A principal função da PGF_{2α} (e

análogos sintéticos) é induzir a regressão do corpo lúteo, resultando na expressão do cio, seguido da ovulação. A principal função dos progestágenos (progesterona e progestágenos sintéticos) é impedir a manifestação do cio, e da ovulação, durante o período de sua administração. A retirada do progestágeno resulta na continuidade do crescimento folicular até a ovulação e reinício de um novo ciclo estral, inclusive em novilhas prepúberes e em vacas em anestro amamentando suas crias (PATTERSON *et al.*, 2000). Semelhante ao GnRH, diversos ésteres de estradiol têm sido extensivamente utilizados no início e final do tratamento de progesterona para controlar e sincronizar o desenvolvimento da onda folicular, bem como para induzir a descarga pré-ovulatória de LH (BÓ *et al.*, 1995; BURKE *et al.*, 1999). Devido ao baixo custo e bons resultados em taxas de prenhez, o uso de estradiol em associação com um dispositivo de liberação contínua de progesterona é o protocolo hormonal mais amplamente utilizado no Brasil para sincronizar a ovulação visando a IATF em gado de corte (BARUSELLI *et al.*, 2012). O protocolo consiste em administrar, por via im, uma dose de estradiol no momento da inserção de um dispositivo intra vaginal ou auricular impregnado de progesterona, seguido, entre sete e nove dias mais tarde, da aplicação de dose luteolítica de PGF_{2α} e nova aplicação de BE no momento, ou um dia posterior, da retirada do implante. Com esse protocolo é possível obter índices satisfatórios de

ovulação (~ 90%) e prenhez (~ 50%) em vacas *Bos indicus* cíclicas ou em anestro (MENEGHETTI *et al.*, 2009).

No entanto, medidas jurídicas à utilização de estrógenos para fins de sincronização do cio devem limitar o uso dessas substâncias em um futuro próximo, como de fato já acontece em países com pecuária mais desenvolvida (LANE *et al.*, 2008; WILTBANK e PURSLEY, 2014). Por esse motivo e para evitar possíveis restrições à exportação da carne bovina brasileira, torna-se necessário encontrar alternativas ao uso de estrógenos para manipular o ciclo estral dos bovinos. Dos protocolos atualmente disponíveis que dispensam o uso de estrógenos, o chamado Co-synch 5 dias + CIDR é o mais popular em países em que o estradiol é proibido (KASIMANICKAM *et al.*, 2012). Esse protocolo, o qual consiste em aplicar uma injeção de GnRH no momento da colocação de um dispositivo liberador de progesterona (d0), injeção de PGF_{2α} na retirada do dispositivo de progesterona (d5) e injeção de uma segunda dose de GnRH 72 horas mais tarde (d8), resulta em bons índices de prenhez, da ordem de 50 a 70% em bovinos *Bos taurus* de corte (BRIDGES *et al.*, 2008; KASIMANICKAM *et al.*, 2012). Contudo, existe limitada informação sobre o desempenho reprodutivo de gado zebu submetido ao tratamento Co-synch 5 dias + CIDR, cuja resposta pode não ser tão eficiente quanto a obtida em raças taurinas, em função das diferenças na fisiologia reprodutiva entre essas subespécies (BARUSELLI *et al.*, 2007). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas de corte *Bos indicus* submetidas à IATF após aplicação de um protocolo hormonal a base de GnRH ou BE.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e condições de manejo

O experimento foi realizado na fazenda experimental Santa Maria, localizada no município de São Pedro, SP (latitude 22°32'55" Sul, longitude 47°54'50" Oeste). O clima do local é considerado tropical de altitude Cfb, com temperaturas médias anuais oscilando entre 20°C e 25°C. Foram utilizadas 100 novilhas da raça Nelore com escore corporal médio de 3,0 ± 0,05 (numa escala de 1 a 5). Em média, as novilhas tinham 24,9 ± 0,27 meses de idade e 310,0 ± 6,1 kg. As novilhas foram manejadas extensivamente em pastagens de *Brachiaria brizanta* e suplementadas com sal proteinado no período da seca e sal mineral durante todo o ano. A atividade

ovariana (ciclando/anestro) foi determinada pela concentração sérica de progesterona >1 ng/mL em uma de duas amostras de sangue coletadas dez dias antes e no dia de início dos tratamentos hormonais. A coleta de sangue foi realizada por punção da veia coccígea, utilizando tubos de 9 ml com gel ativador de coagulo (Vacuette®, Greiner Bio-One, Americana, SP, Brasil) mantidos em gelo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado (3000 rpm durante 10 minutos) e o soro congelado na temperatura de -20°C até posterior análise. As concentrações de progesterona no soro foram determinadas usando um kit comercial de radioimunoensaio em fase sólida (Coat-A-Count progesterona, DPC, Los Angeles, CA, EUA) validado para utilização com soro de bovino. A sensibilidade do teste foi de 0,07 ng/mL e os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 4,8% e 6,9%, respectivamente.

Delineamento experimental

Em dia aleatório do ciclo estral, correspondente ao dia da segunda coleta de sangue para dosagem de progesterona, as novilhas receberam um dispositivo intra vaginal contendo 1 g de progesterona (P4, Primer®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) e foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. O grupo GnRH (n = 51) recebeu uma injeção i.m. de 100 µg de GnRH (Cystorelin®, Merial, Duluth, GA, USA) e o grupo E2 (n = 49) 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil). A P4 foi removida após 5 (grupo GnRH) ou 8 (grupo E2) dias e administrada uma injeção i.m. de 125 µg do análogo de PGF_{2α} cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). Neste momento, o grupo E2 recebeu, adicionalmente, 300 UI de eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brasil). Vinte e quatro horas mais tarde, o grupo GnRH recebeu uma segunda dose de PGF_{2α}, enquanto que o grupo E2 recebeu 1 mg de BE. Em todos os animais foi colocado, na região de transição das vértebras lombo sacrais, um dispositivo de auxílio à detecção do cio (Estrotec®, Rockway, Inc. EUA) e o cio foi monitorado duas vezes ao dia (manhã e tarde) até o momento da IA. O critério para definir a manifestação do cio foi a aceitação da monta, constatada pela observação visual ou pela mudança de cor do Estrotec®, de cinza para vermelho. A IATF foi realizada pelo mesmo inseminador, utilizando sêmen de um único touro, no período de 72-74 horas (grupo GnRH) ou 54-56 horas (grupo E2) após a remoção da P4. Concomitante com a IATF, no grupo GnRH foi administrada uma injeção i.m.

de 100 µg de GnRH. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia 40 dias após a IATF.

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher's para dados não paramétricos, utilizando o Software Graphpad Prism version 6.00 para Mac OS X.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a taxa de prenhez após a IATF foi de 38,8% e 31,4% para os grupos GnRH e E2, respectivamente ($P > 0,05$). Essa taxa foi inferior à obtida por MARTINEZ *et al.* (2001), em vacas mestiças tratadas com estradiol-17 β (56%) ou GnRH (48%). Ainda, em recente estudo com fêmeas Nelore, FERRAZ JR. *et al.* (2014) compararam protocolos semelhantes aos do presente experimento, com a diferença que o protocolo com estradiol considerou em 7 dias a duração do dispositivo de progesterona e a aplicação de cipionato em vez de benzoato de estradiol no final do tratamento. Esses autores não observaram diferença na taxa de prenhez entre os protocolos a base de estradiol e GnRH em novilhas (51,0 vs. 41,0%) e vacas primíparas (25,6 vs. 31,7%), contudo, o protocolo com estradiol resultou em maior ($P < 0,05$) taxa de prenhez nas vacas múltíparas (58,4 vs 32,8%), sugerindo que a categoria dos animais pode influenciar a resposta aos protocolos. Cabe mencionar, no entanto, que diferenças na taxa de prenhez entre rebanhos são relativamente comuns (SMALL *et al.*, 2010) e podem ser atribuídas a diferenças na genética e no manejo, que provavelmente causam complexas interações entre nutrição e a função reprodutiva.

Trinta (61,2%) novilhas do grupo GnRH e 40 (78,4%) do grupo E2 foram consideradas cíclicas, com concentrações séricas de P4 > 1 ng/mL em uma das duas amostras de sangue coletadas com intervalo de dez dias. Houve tendência ($P = 0,07$) das novilhas em anestro do grupo GnRH apresentar menor taxa de concepção em comparação às cíclicas, enquanto que no grupo E2 não foi observada diferença ($P = 0,51$) entre animais cíclicos e em anestro (Tabela 1). Esse resultado sugere que a condição dos ovários pode influenciar a taxa de prenhez com o protocolo GnRH, mas não com o protocolo com estradiol, em que o estímulo do eCG pode ser um fator adicional para estimular o crescimento folicular dos animais com ovários pouco ativos, conforme relatado por SÁ FILHO *et al.* (2010) em novilhas Nelore.

Tabela 1. Taxa de concepção de novilhas Nelore cíclicas ou em anestro submetidas à IATF após tratamento com dispositivo de progesterona associado ao GnRH (Grupo GnRH) ou benzoato de estradiol (Grupo E2)

Condição ovariana	Grupo GnRH	Grupo E2
Ciclando	50,0% (15/30) Aa	32,5% (13/40) Aa
Anestro	21,1% (4/19) Ab	27,3% (3/11) Aa
Total	38,8% (19/49) A	31,4% (16/51) A

Valores seguidos por letras distintas (maiúsculas no horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si ($P = 0,07$).

Nos animais considerados cíclicos, as concentrações de P4 variaram de 0,08 a 7,2 ng/mL, com média de $4,3 \pm 3,2$ ng/mL no início dos tratamentos (dia 0). Embora tenha sido relatado que a presença de um corpo lúteo nesse período pode influenciar a taxa de prenhez (DIAS *et al.*, 2009), diferenças nas concentrações de progesterona nesse período não afetaram a taxa de concepção nos dois grupos de animais, conforme observado na Tabela 2. Esse resultado está em acordo com os relatados em outros estudos com vacas (SOUZA *et al.*, 2009) e novilhas (SMALL *et al.*, 2010) de corte.

Tabela 2. Taxa de concepção em função das concentrações de progesterona plasmática no dia da colocação do dispositivo liberador de progesterona (dia 0) nas novilhas cíclicas

P4 no dia 0 (ng/mL)	Grupo GnRH	Grupo E2
< 1	37,5% (3/8)	20,0% (2/10)
Entre 1 e 4	42,8% (3/7)	46,1% (6/13)
> 4	60,0% (9/15)	29,4% (5/17)

Com exceção de oito animais do grupo GnRH, todas as novilhas manifestaram cio no período da retirada do dispositivo de progesterona até a IA. A dispersão dos cios foi maior nas novilhas do grupo GnRH que no grupo E2 ($P < 0,05$). Trinta e cinco (71,4%) novilhas do grupo GnRH e 6 (33,3%) do grupo E2 manifestaram cio no período de 24 e 54 horas após a retirada do dispositivo de progesterona ($P < 0,05$), enquanto que 6 (11,8%) e 45 (88,2%) do grupo GnRH e E2, respectivamente, manifestaram cio no período da IA ($P < 0,05$). Esse resultado seria consequência da maior eficiência do BE em induzir o crescimento folicular no início do tratamento, bem como do elevado ambiente estrogênico no período da IA, decorrente da segunda aplicação

de BE, conforme demonstrado previamente em vacas mestiças de corte por MARTINEZ *et al.* (2001). Esses autores observaram que a administração de estradiol-17 β no início do tratamento com progestágeno resultou em melhor sincronia do cio em comparação ao tratamento com GnRH. No entanto, a taxa de concepção não foi afetada pela manifestação precoce ou tardia do cio (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de concepção em função do período da manifestação do cio de novilhas Nelore tratadas com dispositivo de progesterona associado ao GnRH (Grupo GnRH) ou benzoato de estradiol (Grupo E2)

Período de cio	Grupo GnRH	Grupo E2
Até 24 h antes da IA	40,0% (14/35)	33,3% (2/6)
No dia da IA	50,0% (3/6)	31,1% (14/45)
Não manifestaram cio	25,0% (2/8)	-

Considerando a taxa de prenhez de 38,8% e 31,4% para os grupos GnRH e E2, o custo dos insumos hormonais para cada prenhez foi de aproximadamente R\$52,45 e R\$49,47, respectivamente. Evidentemente, esses valores são relativos e podem ser sensivelmente diminuídos se alterar o protocolo com GnRH. Por exemplo, em recente estudo utilizando 560 novilhas mestiças de corte, foi considerada desnecessária a primeira injeção de GnRH (CRUPPE *et al.*, 2014) da mesma forma que a segunda aplicação de PGF_{2 α} (CRUPPE *et al.*, 2014; KASIMANICKAM *et al.*, 2014). Isso se aplica também ao protocolo clássico com E2, no qual tem sido questionada a necessidade da injeção de eCG (SMALL *et al.*, 2010; BUTLER *et al.*, 2011), responsável por cerca de 50% do custo desse protocolo. Finalmente, ajustes nos protocolos devem resultar em aumento das taxas de concepção e consequente redução dos custos. Com efeito, embora as taxas de prenhez de novilhas zebrinas tratadas com E2 são semelhantes aos obtidos previamente (BUTLER *et al.*, 2011; ALVAREZ *et al.*, 2012), existem relatos de taxas mais elevadas com esse protocolo (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Da mesma forma, os resultados de prenhez utilizando o protocolo Co-synch 5 dias + CIDR têm variado de 40% a 65% em novilhas mestiças *Bos taurus* de corte, sendo que fatores relacionados com o escore do trato reprodutivo (RTS) parecem estar implicados na resposta ao tratamento (GUTIERREZ *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

O uso de GnRH pode ser recomendado

para substituir o estradiol nos protocolos de sincronização do cio visando a IATF em novilhas Nelore. Pesquisas adicionais são necessárias para tornar mais eficientes e econômicos os protocolos alternativos ao uso de estrógenos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Eduardo Castanho Ferraz e ao pessoal de campo da Fazenda Santa Maria pela sua colaboração na lida com os animais. Este experimento teve apoio financeiro da FAPESP (processo 2011/14358-9).

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, R.H. **Considerações sobre o uso da inseminação artificial em bovinos**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Inseminacao/Index.htm>. Acesso em: 20 dez. de 2014.
- ALVAREZ, R.H. **Sincronização do cio em bovinos**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia: 2000. (Boletim Técnico, IZ 32)
- ALVAREZ, R.H.; MELO, A.J.F.; CARVALHO, N.A.T. Timed insemination efficiency following progesterone-based synchronization protocols associated to GnRH, estradiol and estradiol plus eCG in *Bos indicus* beef heifers. **Animal Reproduction**, v.9, p.943-944, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebrinas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.205-211, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.; SALA, R.V.; VIERA, L.M.; SÁ FILHO, M.F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-152, 2012.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.
- BRIDGES, G.A.; HELSER, L.A.; GRUM, D.E.; MUSSARD, M.L.; GASSER, C.L.; DAY, M.L. Decreasing the interval between GnRH and PGF_{2 α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v.69, p.843-851, 2008.
- BURKE, C.R.; BOLAND, M.P.; MACMILLAN, K.L. Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.23-33, 1999.

- BUTLER, S.A.A.; ATKINSON, P.C.; BOE-HANSEN G.B.; BURNS B.M.; DAWSON, K.; BO, G.A.; MCGOWAN, M.R. Pregnancy rates after fixed-time artificial insemination of Brahman heifers treated to synchronize ovulation with low-dose intravaginal progesterone releasing devices, with or without eCG. **Theriogenology**, v.76, p.1416-1423, 2011.
- CRUPPE, L.H.; LAKE, S.L.; ABREU, F.M.; KRUSE, S.G.; BIRD, S.L.; HEATON, K.; HARSTINE, B.R.; DAY, M.L.; BRIDGES, G.A. The effect of the initial GnRH and dose of PGF2 α on pregnancy rate to TAI in beef heifers submitted to the 5-d CO-Synch + CIDR program. **Journal of Animal Science**, v.92, p.697-698, 2014. Supplement, 2.
- DIAS, C.C.; WECHSLER, F.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2 α) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v.72, p.378-385, 2009.
- FERRAZ JR., M.V.C.; PIRES, A.V.; BIEHL, M.V.; SARTORI, R.; GONÇALVES, J.R.S.; MOREIRA, E.M.; SANTOS, M.H.; CRUPPE, L.H. The use of 5-d CO-synch+CIDR and 7-d EB+CIDR synchronization programs in Nelore females. **Journal of Animal Science**, v.92, p.697-699, 2014. Supplement, 2.
- GUTIERREZ, K.; KASIMANICKAM, R.; TIBARY, A.; GAY, J.M.; KASTELIC, J.P.; HALL, J.B.; WHITTIER, W.D. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v.81, p.918-924, 2014.
- KASIMANICKAM, R.; ASAY, M.; FIRTH, P.; WHITTIER W.D.; HALL, J.B. Artificial insemination at 56 h after intravaginal progesterone device removal improved AI pregnancy rate in beef heifers synchronized with five day CO-Synch . controlled internal drug release (CIDR) protocol. **Theriogenology**, v.77, p.1624-1631, 2012.
- KASIMANICKAMA, R.K.; FIRTH, P.; SCHUENEMANN, G.M.; WHITLOCK, B.K.; GAY, J.M.; MOORE, D.A.; HALL, J.B.; WHITTIER W.D. Effect of the first GnRH and two doses of PGF2 α in a 5-day progesterone-based CO-Synch protocol on heifer pregnancy. **Theriogenology**, v.81, p.797-804, 2014.
- LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; CROWE, B.C. Oestrous synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.1-16, 2008.
- MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.221-229, 2001.
- MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cattle: I. Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179-189, 2009.
- PATTERSON, D.J.; WOOD, S.L.; KOJIMA, F.M.; SMITH, M.F. Improved synchronization of estrus in postpartum suckled beef cows with a progestin-GnRH-prostaglandin F2 α (PG) protocol. **Journal of Animal Science**, v.78, p.218-222, 2000. Supplement, 1.
- SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L.U.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L.A.; SALES, J.N.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.182-187, 2010.
- SMALL, J.A.; COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; ERICKSON, N.E.; MAPLETOFT, R.J. Effects of presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, fixed-time artificial insemination in beef heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v.90, p.23-34, 2010.
- SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A.; ARAÚJO, R.; BÓ, G.A.; WILTBAN. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, p.10-21, 2009.
- WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v.81, p.170-185, 2014.